

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE / IMMUNOLOGIE

PAR

ROGER DUBUC

MISE AU POINT ET CONTRÔLE DE LA QUALITÉ
DE LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)
APPLIQUÉE AU DIAGNOSTIC DES PARVOVIRUS PORCINS (PPV)

Avril 1996

*À mes parents,
Claire et Jacques,
pour leur indéfectible confiance.*

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
SOMMAIRE	xiv
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6

1^{ère} PARTIE : LE PARVOVIRUS PORCIN

1. LES PARVOVIRUS	7
1.1 <i>Classification des parvovirus</i>	7
1.2 <i>Tropisme cellulaire</i>	9
1.3 <i>Pathogénicité générale</i>	9
1.4 <i>Structure du virion</i>	11
1.5 <i>Structure du génome viral</i>	13
1.6 <i>Réplication</i>	14
2. LE PARVOVIRUS PORCIN (PPV)	15
2.1 <i>Introduction</i>	15
2.2 <i>Différents isolats de PPV</i>	17
2.2.1 <i>Propriétés antigéniques</i>	17
2.2.2 <i>Propriétés pathogéniques</i>	18
2.2.3 <i>Pathogénicité et réponse immunitaire</i>	20
3. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DU PPV	22
3.1 <i>Rôle des séquences non codantes</i>	25
3.2 <i>Transcrits, épissage et protéines produites</i>	27
3.3 <i>Fonctions des protéines non-structurales</i>	28
4. TROPISME ET BARRIÈRES D'HÔTES	30
4.1 <i>Importance des protéines structurales</i>	30

4. TROPISME ET BARRIÈRES D'HÔTES (suite)	
4.2 Structures conservées dans les capsides de parvovirus	31
4.3 Cartographie des résidus impliqués dans le tropisme du PPV	34
4.4 Rôle du déterminant allotropique	37
5. DIAGNOSTIC ET PRÉVENTION	40
<u>II^e PARTIE : LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)</u>	
6. PCR ET DIAGNOSTIC	42
6.1 Historique et principe	42
6.2 Notion d'efficacité	44
6.3 Effet plateau	45
6.4 Limitations de la PCR	46
6.5 Diagnostic par PCR	48
7. PCR QUANTITATIVE	51
7.1 Différentes approches	52
7.2 Détection et quantification des produits de PCR	55
8. DÉTECTION DES MUTATIONS PAR PCR	58
8.1 Détection de séquences mutantes connues	59
8.2 Détection de mutations inconnues	62
MATÉRIEL ET MÉTHODES	65
1. MATÉRIEL DE DÉPART	66
1.1 Souche virale de PPV	66
1.2 Constructions de laboratoire	66
1.2.1 Culture	67
1.2.2 Purification	68
1.2.3 Quantification	69
1.3 Échantillons cliniques	70
2. PCR DIFFÉRENTIELLE	71
2.1 Amorces utilisées	72
2.2 Conditions d'opération	75
2.3 "Modus operandi"	76
2.4 Visualisation des produits de PCR	77
3. ÉTUDE DE STABILITÉ DE L'ADN	77
3.1 Préparation des matrices	77

3. ÉTUDE DE STABILITÉ DE L'ADN (suite)	
3.2 Dilutions et entreposage	78
3.3 Précipitation et resuspension de l'ADN	79
3.4 Conditions de PCR	79
4. PCR QUANTITATIVE	80
4.1 Standard interne	81
4.1.1 Mutagénèse dirigée	81
4.1.2 Criblage des transformants par digestions enzymatiques	87
4.1.3 Vérification par séquençage	88
4.1.4 Transfections de cellules eucaryotes	89
4.1.5 Évaluation des transfections	90
4.2 PCR compétitive	91
4.2.1 Conditions de PCR	91
4.2.2 Réamplification de produits de PCR	93
4.2.3 Purification et estimation de produits de PCR	93
4.3 Système de détection de format ELISA	94
4.3.1 Principe et méthode	94
4.3.2 Marquage et dosage de sondes moléculaires	99
4.3.3 Conditions d'opération	101
5. ÉTUDE DES CAS CLINIQUES	103
5.1 Préparation des échantillons	103
5.1.1 Méthode Hirt modifiée	104
5.1.2 Méthode à base de thiocyanate de guanidine	105
5.1.3 Trousse "Elu-Quik"	105
5.1.4 Lyse alcaline rapide	106
5.1.5 Protéinase K rapide	107
5.2 PCR différentielle et PCR quantitative	108
5.3 "Southern Blot"	108
RÉSULTATS	110
1. PCR DIFFÉRENTIELLE	111
1.1 Conditions préliminaires	111
1.2 Choix des amorces	112
1.3 Température d'hybridation et concentration des amorces	120
1.4 Conditions d'opération	123
1.5 "Modus operandi"	126
1.6 En résumé	128

2. ÉTUDE DE STABILITÉ DE L'ADN	131
2.1 <i>Résultats obtenus</i>	131
2.2 <i>Présence d'inhibiteurs</i>	134
3. PCR QUANTITATIVE	139
3.1 <i>Standard interne</i>	139
3.1.1 <i>Mutagenèse dirigée</i>	139
3.1.2 <i>Transfections de cellules porcines</i>	140
3.2 <i>PCR compétitive</i>	143
3.2.1 <i>Résultats préliminaires</i>	143
3.2.2 <i>Problèmes de contamination</i>	146
3.3 <i>Système de détection de format ELISA</i>	147
3.3.1 <i>Conditions d'opération</i>	147
3.3.2 <i>Courbe standard et purification de produits</i> <i>de PCR</i>	152
3.3.3 <i>Digestions enzymatiques</i>	153
3.3.4 <i>Hétéroduplex et réamplification</i>	159
3.4 <i>Quelques données sur l'efficacité de la PCR</i>	159
4. CAS CLINIQUES	162
4.1 <i>Procédures d'extraction</i>	162
4.2 <i>PCR différentielle</i>	164
4.3 <i>PCR quantitative</i>	165
DISCUSSION	170
1. PCR DIFFÉRENTIELLE	171
1.1 <i>Choix des amorces</i>	172
1.2 <i>Température d'hybridation</i>	179
1.3 <i>Discrimination et dNTP</i>	181
1.4 <i>Équilibre des amplicons</i>	182
1.5 <i>Conditions d'opération et "modus operandi"</i>	185
1.6 <i>Application aux cas cliniques</i>	188
1.6.1 <i>Procédures d'extraction</i>	188
1.6.2 <i>Diagnostic par PCR différentielle</i>	190
1.6.3 <i>Cas de PPV entérique</i>	191
2. PCR UTILISÉE EN DIAGNOSTIC	194
2.1 <i>Étude de stabilité et présence d'inhibiteurs</i>	194
2.2 <i>Contamination et faux positifs</i>	197
2.3 <i>Recommandations quant au contrôle de qualité</i>	199

3. PCR QUANTITATIVE	203
3.1 <i>Standard interne</i>	203
3.2 <i>Données supplémentaires quant à l'efficacité de la PCR</i>	207
3.3 <i>Détection ELISA et digestions enzymatiques</i>	209
3.4 <i>Alternatives possibles</i>	212
CONCLUSION	216
REMERCIEMENTS	220
BIBLIOGRAPHIE	222

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Parvovirus autonomes des vertébrés	8
Tableau 2	Pathogénicité, chez le porc, de quatre isolats de parvovirus porcin	19
Tableau 3	Mutations génomiques observées et modifications anticipées des acides aminés, au niveau de la VP-2 de différents isolats et souches de PPV	32
Tableau 4	Amorces PPV utilisées lors de la mise au point de la PCR différentielle	74
Tableau 5	Étude de stabilité de l'ADN	133
Tableau 6	Présence d'inhibiteurs: étude de la dilution 4 de Promega	135
Tableau 7	Transfections de cellules porcines	144
Tableau 8	Exemple de digestions effectuées en plateau	156
Tableau 9a	Concentrations d'enzymes et protocoles de digestion	158
Tableau 9b	Digestions en microtubes	158
Tableau 10	Hétéroduplex et réamplification	160

Tableau 11a	Efficacité de la PCR en fonction de la quantité d'ADN de départ	163
Tableau 11b	Efficacité de la PCR en fonction des premiers cycles d'amplification	163
Tableau 12	Diagnostic "classique" et PCR différentielle	166
Tableau 13	PCR quantitative appliquée à 30 cas cliniques	168
Tableau 14	Valeur relative des mésappariements utilisés lors de la PCR différentielle	177

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Organisation génomique du PPV et stratégies d'épissage	23
Figure 2	Localisation des résidus critiques du PPV sur la structure secondaire du CPV	35
Figure 3	Représentation schématique d'une unité asymétrique de la capside du PPV	38
Figure 4	Représentation schématique de la stratégie de mutagenèse dirigée	84
Figure 5	Représentation schématique de l'ELISA appliquée aux produits de PCR	96
Figure 6	Première stratégie de PCR différentielle	113
Figure 7	Deuxième stratégie de PCR différentielle	117
Figure 8	Résultats obtenus par PCR différentielle	129
Figure 9	Les "trous" en PCR	137
Figure 10	Vérification par séquençage des transformants 11 et 22	141
Figure 11	Courbe d'absorbance PCR-ELISA	149
Figure 12	Amorce mutagène (<i>EcoRI</i> → <i>BamHI</i>)	204

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	Angström (10^{-10} m)
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	American Type Culture Collection
b	base
BSA	albumine sérique bovine
[C]	concentration
cpm	compte par minute
ddNTP	didésoxyribonucléotide triphosphate
DICT ₅₀	dose infectieuse en culture de tissus
Dig	digoxigénine
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
DMSO	dimethyl sulfoxide
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
DO	densité optique
ECP	effet cytopathique
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
g	attraction terrestre
h	heure
HA	hémagglutination
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
IF	immunofluorescence directe
IFI	immunofluorescence indirecte
IHA	inhibition de l'hémagglutination

kb	kilobase
kDa	kilodalton
mBar	millibar
2-ME	2-mercaptoéthanol
min	minute
NBT	nitrobleu tetrazolium
nm	nanomètre (10^{-9} m)
NS	protéine virale non structurale
nt	nucléotide
NV	neutralisation virale
ORF	cadre de lecture ouvert
pb	paire de bases
PBS	saline en tampon phosphate
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PFT	trompe de Fallope porcine
PT	testicule de porc
RF	forme répliquative
RNAse	ribonucléase
rpm	révolution par minute
RT-PCR	transcription inverse, suivie de PCR
SDS	sulfate de dodécyl de sodium
sec	seconde
SFB	sérum foetal bovin
TdT	Terminal desoxynucleotidyl Transferase
Th	cellule T auxiliaire
TMB	tétraméthylbenzidine
U	unité
UV	ultra-violet
V	volt
VP	protéine virale structurale
X-phosphate	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

SOMMAIRE

Ce projet de maîtrise visait deux objectifs principaux. Premièrement, doter le Service de diagnostic virologique vétérinaire de l'Institut Armand-Frappier, subventionné par le Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec (MAPAQ), d'une méthode d'analyse permettant de distinguer les souches pathogènes (virulentes) et non pathogènes (vaccinales) de parvovirus porcin (PPV). L'approche envisagée était basée sur la biologie moléculaire du virus et impliquait l'utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette utilisation de la PCR comme instrument de diagnostic établissait le deuxième objectif de la recherche: évaluer les possibilités et les limites de cette nouvelle technologie en fonction du Service et surtout, définir une stratégie pouvant en assurer le contrôle de qualité.

Mettant à profit l'identification des déterminants allotropiques de différentes souches de PPV (Bergeron *et al.*, 1996), nous avons développé une méthode de PCR discriminant les souches pathogènes et non pathogènes de ce virus. Dans cette optique, deux paires d'amorces sont utilisées à l'intérieur d'un même cocktail d'amplification; de telle sorte qu'alternativement deux amplicons de longueurs différentes (révélateurs de la souche de PPV) de même qu'un amplicon commun (indicatif de la présence de PPV) sont générés. Dans chaque combinaison, une seule des deux amorces est spécifique à la souche, et ce, grâce aux deux derniers nucléotides utilisés en 3'. De cette manière, nous avons entre autre identifié de façon non équivoque un PPV de type virulent isolé de l'intestin d'un porc diarrhéique.

Durant la mise au point de cette technique, nous avons rencontré des problèmes de reproductibilité de la PCR, ce qui nous a amené à entreprendre une étude de stabilité de l'ADN plasmidique de même qu'à tenter de cerner le rôle d'éventuels inhibiteurs de la réaction de polymérisation en chaîne. Quoique difficilement identifiables, ces inhibiteurs ont pu être transférés d'un tube à l'autre. À l'inverse, nous avons aussi rencontré des problèmes de contamination moléculaire générant de faux résultats positifs en PCR.

Afin d'établir une philosophie de contrôle de qualité, nous avons privilégié une approche quantitative de la PCR. Nous avons mis au point une réaction de PCR classique où l'amplicon de PPV généré contient naturellement un site de restriction *EcoRI*. À partir d'un plasmide contenant le génome entier et infectieux du PPV-NADL2 (Bergeron *et al.*, 1993), nous avons, par mutagenèse dirigée, créé un génome PPV mutant où le site *EcoRI* est transformé en site de restriction *BamHI*. Ce gabarit sert de standard interne dans la réaction de PCR classique et une seule paire d'amorces amplifie indistinctement et avec la même efficacité les PPV sauvage et mutant.

Une des amorces étant biotinylée en 5', il devient possible de capturer les amplicons sur une micro-plaque enrobée de streptavidine. Après dénaturation alcaline, les ADN monocaténares capturés sont hybridés, en aval du site de restriction, à une courte sonde dont l'extrémité 3' est marquée à la digoxigénine. Chaque échantillon

occupe au moins trois cupules. La première cupule, intacte, n'est pas soumise aux enzymes de restriction et représente la quantité totale d'amplicons. Les deuxième et troisième cupules sont respectivement soumises à la digestion enzymatique de *EcoRI* et de *BamHI*. La coupure *EcoRI* élimine le signal généré par le PPV sauvage, mais n'affecte pas celui du standard interne. La coupure *BamHI* élimine le signal généré par le standard interne, mais n'affecte pas celui du PPV sauvage.

Subséquentement à la digestion enzymatique, un anticorps anti-Dig, conjugué à la peroxydase, sert de révélateur par son action sur le substrat (TMB:H₂O₂) et la coloration produite est lue au spectrophotomètre. De cette façon, la performance globale du système est évaluée grâce à la somme des absorbances, obtenues avec les cupules soumises aux enzymes de restriction, qui doit égaler l'absorbance de la cupule intacte. De plus, un signal absent ou trop faible de la part du standard interne permet d'éliminer les éventuels faux négatifs. L'ajout d'échantillons ne contenant pas d'ADN sert de contrôle pour les faux positifs.

Les essais préliminaires ayant porté sur des constructions de laboratoire, nous sommes ensuite tournés vers les échantillons cliniques. Une centaine de cas, la plupart étant des foetus de porc déjà analysés selon les méthodes conventionnelles de diagnostic vétérinaire, a servi de matériel de base. Plusieurs méthodes d'extraction du PPV ont été essayées. Finalement, une procédure utilisant la protéinase K additionnée

directement au tampon de PCR a été retenue. Nous avons également tenté de transférer des cellules eucaryotes avec l'ADN plasmidique du PPV mutant et théoriquement infectieux. Cette démarche visait à générer un véritable virus modifié pouvant servir non seulement de standard interne en PCR, mais aussi de contrôle d'efficacité de l'extraction du PPV des échantillons cliniques. Malheureusement, toutes les tentatives sont demeurées vaines.

Sur 119 cas analysés par PCR différentielle, sept ont été trouvés positifs au PPV; exactement comme l'isolement par passages sur cultures cellulaires, mais nettement moins que l'immunofluorescence sur coupes de tissus qui déclarait 56% des échantillons infectés de PPV. Les sept cas positifs présentaient tous un profil de PPV pathogène. L'analyse d'une trentaine de spécimens par PCR quantitative s'est révélée beaucoup plus problématique. La présence occasionnelle d'hétéroduplex, mais surtout un manque de cohérence au niveau des digestions enzymatiques, exigeraient une poursuite de la recherche.

INTRODUCTION

Le parvovirus porcin (PPV) est probablement la principale cause d'infertilité chez les porcs. Par définition, la manifestation ultime de cette infertilité est une incapacité à reproduire; mais, pour le producteur de porcs, celle-ci se traduit surtout à l'intérieur de son élevage par un nombre anormalement bas de portées ou encore de rejetons par portée. L'infection au PPV entraîne un syndrome reproducteur incluant la résorption de l'embryon, la momification des foetus, la mortinatalité, l'avortement et l'infertilité comme telle (Dunne *et al.*, 1965; Mengeling et Cutlip, 1976). Plusieurs isolats de PPV ont été recouverts de par le monde à partir d'échantillons cliniques ou comme contaminants de cultures cellulaires (revue par Molitor et Joo, 1990). Essentiellement, tous ces isolats ne présentent aucune différence antigénique en regard des antisérums polyclonaux utilisés à ce jour. De plus, la caractérisation moléculaire de certaines des souches virulentes et non virulentes de PPV a révélé une homologie de séquence presque parfaite (99%) entre les différents génomes (Bergeron *et al.*, 1996).

Paradoxalement, malgré cette homogénéité des souches de parvovirus porcin, on observe des différences frappantes en terme de pathogénicité. Au moins quatre groupes de PPV ont été identifiés: non pathogènes (KBSH, NADL-2), pathogènes pour le foetus non immunocompétent (NADL-8), pathogènes pour le foetus immunocompétent et causant une dermatite chez le porc adulte (Kresse), et finalement, les souches entériques. En plus de l'intérêt scientifique que pose cette situation, il apparaît évident que la bonne gestion du cheptel porcin (e.g., innocuité et efficacité des vaccins utilisés,

fiabilité des études épidémiologiques) nécessite des épreuves diagnostiques permettant de discriminer les différentes souches de PPV.

Le parvovirus porcin ressemble de plusieurs façons au parvovirus murin MVM quant au tropisme et à la pathogénèse. Les souches non pathogènes PPV-NADL-2 et MVMp (prototype) sont beaucoup moins virémiques que leurs contreparties PPV-NADL-8 et MVMi (lymphotropique). L'infection généralisée des cellules hématopoïétiques, des lymphocytes et de l'endothélium des capillaires causée par MVMi trouve son équivalent lors de l'infection foetale par un PPV de type virulent (Tijssen et Bergeron, 1994). Finalement, leurs différentes souches peuvent être différenciées par un déterminant allotropique associé à la capsid virale. En effet, la substitution de deux acides aminés de la protéine structurale VP1/VP2 est suffisante pour que la souche MVMi lymphotropique puisse se répliquer dans les fibroblastes comme MVMp (Ball-Goodrich et Tattersall, 1992). De la même façon, le changement de trois résidus au niveau de la VP2 permet d'invertir les tropismes cellulaires des PPV de type virulent et avirulent (Bergeron *et al.*, 1996). Connaissant ce déterminant allotropique, de même que la séquence nucléotidique le sous-tendant, nous proposons dans la recherche qui suit un test diagnostique permettant de discriminer les souches pathogènes et non pathogènes de PPV.

Il existe de nombreuses méthodes pouvant détecter les mutations nucléotidiques. La grande majorité de celles-ci font appel directement ou indirectement à l'utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La section huit de la revue bibliographique abordera précisément ce thème. Retenons seulement que, dans le cas de mutations connues, la possibilité de jouer sur l'hybridation spécifique d'une amorce à un allèle déterminé permet d'utiliser la PCR avec beaucoup de précision pour poser un diagnostic différentiel.

Malheureusement, aussi séduisante soit-elle, l'utilisation de la PCR en diagnostic pose de nombreux problèmes. De fait, son formidable pouvoir d'amplification constitue aussi son talon d'Achille. La moindre contamination, provenant d'échantillons différents ou d'amplifications précédentes, peut occasionner un faux positif. À l'inverse, et souvent pour des raisons obscures, une réaction peut carrément ne pas fonctionner et causer un faux négatif. De plus, de façon courante, on observe des fluctuations dans l'efficacité de la réaction occasionnant une pauvre reproductibilité des résultats. Or, tous ces critères sont d'une importance capitale en diagnostic.

Les cinq dernières années ont vu l'émergence d'un nombre croissant de stratégies visant à doter la PCR d'une dimension quantitative. Depuis les travaux de pionniers de Becker-André et Hahlbrock (1989), Wang *et al.* (1989), Gilliland *et al.* (1990), la plupart des méthodes développées ont eu pour but le dosage de gènes rares (e.g.,

mutations somatiques ou intégration d'ADN viral) ou encore l'étude des mécanismes contrôlant la transcription (quantification des ARN messagers). L'approche générale a été et demeure l'utilisation d'un standard connu et dosé, amplifié en même temps que l'acide nucléique à tester. La comparaison finale de la quantité d'amplicons provenant de l'échantillon à celle du standard permet de déduire le nombre initial de copies de l'acide nucléique testé.

Une retombée non négligeable de tous ces efforts est d'avoir jeté les bases d'un contrôle de la qualité des réactions de PCR et de RT-PCR (transcription inverse, suivie de PCR). Cet acquis est crucial quant à l'utilisation de ces techniques en diagnostic. Non seulement l'ajout d'un standard interne dans la PCR quantitative permet-il d'envisager un véritable contrôle de la qualité, mais aussi l'établissement d'une valeur-seuil diagnostique. C'est-à-dire un "cut-off" discriminant les résultats positifs et négatifs, compte tenu des limites de la méthode d'analyse et du système de détection choisis.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I^{ère} PARTIE : LE PARVOVIRUS PORCIN

1. LES PARVOVIRUS

1.1 Classification des parvovirus

Les parvovirus sont les plus petits virus à ADN infectant des animaux. Jusqu'à tout récemment, le cinquième rapport du Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV, 1991) divisait la famille des *Parvoviridae* en trois genres. Le premier, les *Densovirus*, était constitué de virus isolés principalement d'insectes. Les deux autres genres regroupaient des virus infectant une très grande diversité d'espèces animales. Le genre *Dependovirus*, dont le principal représentant était le virus AAV ("adeno-associated virus"), englobait les parvovirus défectifs. La réplication de ces virus reposant sur la coinfection par un virus auxiliaire ("helper") tels les virus adéno ou herpès. La majorité des parvovirus (Tableau 1) était rassemblée dans le troisième genre: les parvovirus autonomes (*Parvovirus*). Ces derniers ayant une réplication indépendante de la présence de virus auxiliaires dans les cellules hôtes (Siegl *et al.*, 1985).

Le sixième rapport de l'ICTV, publié en 1995, propose la création de deux sous-familles: les *Parvovirinae* et les *Densovirinae*. La première inclue les *Parvovirus*

Tableau 1

Parvovirus autonomes des vertébrés.

VIRUS	HÔTE	ACRONYME
Membres reconnus		
Rat virus	rat	RV
H-1 virus	rat	H-1
RT virus	rat	RT
TVX	inconnu	TVX
Minute virus of mice	souris	MVM
LuIII virus	inconnu	LuIII
B19	homme	B19
Porcine parvovirus	porc	PPV
Bovine parvovirus	boeuf	BPV
Feline parvovirus	chat	FPV
Mink enteritis virus	vison	MEV
Canine parvovirus	chien	CPV
Raccoon parvovirus	raton	RPV
Lapine parvovirus	lapin	LPV
Aleutian disease virus	vison	ADV
Goose parvovirus	oie	GPV
Membres possibles		
Minute virus of canine	chien	MCV
HB virus	homme ?	HB
RA-1	homme	RA-1

(Cotmore et Tattersall, 1987)

(autonomes), les *Erythrovirus* (B19 humain) et les *Dependovirus* (AAV); alors que la deuxième regroupe les *Densovirus*, les *Contravirus* et les *Iteravirus*.

1.2 Tropisme cellulaire

La pénétration et, plus tard, l'accumulation intracellulaire de produits viraux sont indépendantes du cycle cellulaire (Siegl et Gautschi, 1973; Rhode, 1973). Par contre, la réplication de l'ADN et l'expression des gènes viraux dépendent entièrement d'une ou de plusieurs fonctions cellulaires qui se produisent durant la phase S du cycle cellulaire (Tennant *et al.*, 1969; Tattersall, 1972; Siegl et Gautschi, 1973; Rhode, 1973). Cette dépendance absolue pour la phase S expliquerait une plus grande résistance des animaux adultes face à l'infection virale, contrairement aux foetus et aux nouveaux-nés (Margolis et Kilham, 1975).

1.3 Pathogénicité générale

Les parvovirus causent souvent des problèmes de reproduction provoquant l'apparition d'anomalies foetales ou néonatales. L'inoculation intracérébrale de nouveaux-nés, particulièrement chez les cobayes, cause des difformités caractéristiques de type mongoloïde (Toolan, 1960; Kilham, 1961).

Plusieurs parvovirus traversent le placenta pour infecter le fœtus. Des facteurs comme la voie d'infection, la souche virale et la dose, l'espèce animale et le moment de l'infection durant la grossesse influencent l'apparition de la maladie. Tôt dans la grossesse, une forte dose virale peut provoquer une infection foetale généralisée conduisant à la résorption ou à la momification des embryons. L'infection plus tardive peut causer, en plus de l'hypoplasie cérébrale, une encéphalopathie hémorragique, une entérite ou une hépatite néonatale (Kilham et Margolis, 1975; Siegl, 1984a). Dans tous les cas, des populations cellulaires ayant une activité mitotique élevée sont impliquées.

D'autre part, même si la majorité des tissus adultes sont mitotiquement peu actifs, l'épithélium intestinal ainsi que le système hématopoïétique contiennent une grande proportion de cellules en division. Ces tissus sont en fait la cible de certains parvovirus, et ceci peut conduire à l'apparition de maladies fatales chez l'animal adulte. Le meilleur exemple de ce type de pathogénicité provient des parvovirus FPV, MEV et CPV (Siegl, 1984b). Le virus ADV (Porter et Cho, 1980) et le virus RV (Coleman *et al.*, 1983) causent des maladies mortelles chez le vison adulte et chez le jeune rat. La plupart des parvovirus autonomes réduisent le nombre de lymphocytes circulants (panleucopénie). Celle-ci, lors d'une infection au B19 humain, peut conduire à une aplasie fatale chez l'individu hémolytiquement compromis (Kurtzman *et al.*, 1989).

1.4 Structure du virion

Les parvovirus sont des particules nues d'un diamètre de 20 à 25 nm contenant un génome d'environ 5000 nucléotides (Siegl *et al.*, 1985). L'ADN représente de 19 à 32% de la masse totale des virions, tandis que les protéines de la capsid forment le reste. Ces particules ne contiennent pas de lipides, d'hydrates de carbone, d'enzymes viraux ou cellulaires ou de protéines de faible poids moléculaire comme des histones (Siegl *et al.*, 1985). La majorité des particules infectieuses ont une densité d'environ 1,41 g/cm³, un coefficient de sédimentation de 110 S, et un poids moléculaire de 5,5 à 6,2 x 10⁶ (Siegl *et al.*, 1985). Même si la forme infectieuse est la plus fréquemment isolée d'animaux malades, on retrouve une quantité abondante de particules défectives dans les stocks de virus produits sur culture cellulaire. Ces dernières contiennent une quantité sous-molaire d'ADN. Elles ont une densité de 1,32 g/cm³, un coefficient de sédimentation de 70 S, et un poids moléculaire de 4,2 x 10⁶ (Ward et Tattersall, 1982).

Les virions matures de la majorité des parvovirus autonomes possèdent une capsid composée de trois polypeptides principaux. Deux protéines, soit la VP1 (83-86 kDa) et la VP2 (64-66 kDa) sont des produits de traduction (Cotmore *et al.*, 1983; Rhode et Paradiso, 1983); tandis que la troisième, la VP3, provient du clivage protéolytique de la VP2 (Clinton et Hayashi, 1976; Tattersall *et al.*, 1977). L'examen au microscope électronique révèle que ces particules en forme d'icosaèdre sont composées de plusieurs capsomères.

Les techniques récentes de cristallographie par rayons X, décrites et développées en grande partie par M.G. Rossmann, ont été utilisées pour résoudre la structure tridimensionnelle de certains parvovirus. Celle du parvovirus canin a été décrite par Tsao et collaborateurs (1991), de même que par Wu et Rossmann (1993). La structure du parvovirus félin a aussi été résolue (Agbandje *et al.*, 1993). Essentiellement, ces études révèlent une capsid de structure T=1, contenant 60 copies de protomères composés d'une combinaison de protéines VP1 et VP2. La portion amino-terminale de certaines copies de VP2 est accessible à l'extérieur des particules contenant de l'ADN (virions complets). La structure des VP1 et VP2 allant du 38^e résidu de la VP2 à l'extrémité carboxy-terminale démontre une organisation centrale où huit feuillets- β anti-parallèles forment un "baril- β " (Rossmann et Johnson, 1989). De ce baril émergent des boucles élaborées (reliant entre eux les feuillets- β) et qui composent la plus grande partie de la surface extérieure de la capsid. La topographie de surface révèle une structure cylindrique chapeautant l'axe de symétrie d'ordre cinq¹, et elle-même entourée d'une dépression circulaire de 15Å. On retrouve aussi un autre creux de 15Å s'étendant le long de l'axe de symétrie d'ordre deux. Finalement, une éminence de 22Å de hauteur par 70Å de largeur domine l'axe de symétrie d'ordre trois. C'est d'ailleurs dans cette région que l'on retrouve le plus de variations parmi les parvovirus étudiés (Chapman et Rossmann, 1993).

¹ La terminologie employée s'inspire de Girard, M. et L. Hirt. 1989. Virologie moléculaire. Doin, Paris. Pages 121-186.

1.5 Structure du génome viral

Le génome des parvovirus est formé d'une molécule d'ADN linéaire d'une longueur d'environ 5000 nucléotides. Cet ADN est composé d'une région codante monocaténaire centrale (90%) flanquée de deux courts palindromes terminaux capables de se replier dans une structure en forme d'épingle à cheveux (Bourguignon *et al.*, 1976). Le brin encapsidé est d'une façon prédominante d'une seule polarité, invariablement le brin "-" (complémentaire à l'ARNm), ou plus rarement des deux polarités encapsidés dans des virions différents (Siegl *et al.*, 1985).

Chez tous les parvovirus analysés, tous les cadres ouverts de lecture (ORF) se retrouvent sur un seul des deux brins de l'ADN répliatif qui, par définition, est le brin "+". On observe que le génome est organisé en deux grands cadres de lecture couvrant la presque totalité de celui-ci. On remarque aussi la présence d'un certain nombre d'ORF, plus petits, dont la position varie d'un virus à l'autre (Shade *et al.*, 1986). Le grand cadre de lecture gauche code pour les protéines virales non-structurales, tandis que celui de droite code pour les polypeptides structuraux (la Figure 1A, p. 24, illustre bien ce type d'organisation).

Comme le PPV est représentatif des parvovirus autonomes, nous concentrerons l'étude fine du génome viral de ce genre à la section trois de la revue bibliographique.

1.6 Réplication

L'infection virale productive est initiée par l'adsorption du virion aux récepteurs spécifiques situés à la surface cellulaire. La nature exacte de ces récepteurs est inconnue, mais des résidus d'acide N-acétylneuraminique semblent y jouer un rôle essentiel (Cotmore et Tattersall, 1987). La pénétration des virus se fait à travers des puits d'endocytose ("coated pits") (Linser *et al.*, 1977). La façon dont le virus pénètre la membrane cytoplasmique et la translocation de ce dernier au noyau de la cellule reste inconnue. Le peu d'ADN monocaténaire libre dans le cytoplasme cellulaire laisse présumer que peu de virus sont décapsidés et/ou que cet événement se produit à l'intérieur du noyau. La réplication de l'ADN viral passe par trois étapes distinctes: la synthèse du brin d'ADN parental complémentaire, l'amplification de l'ADN de forme bicaténaire, et enfin, l'encapsidation du brin d'ADN monocaténaire excisé.

Un système d'auto-amorçage à l'extrémité génomique 3', couplé à un mécanisme de transfert de la structure en épingle à cheveux, forment la base du modèle original de réplication nommé "épingle à cheveux roulante" ("rolling hairpin") (Tattersall et Ward, 1976). Des études subséquentes de Astell et collaborateurs (1985) et de Berns (1990) ont développé l'idée. Selon ce modèle, le palindrome terminal 3' de la chaîne virale est utilisé par la polymérase de la cellule hôte pour amorcer la synthèse du brin complémentaire. Ceci produit une molécule bicaténaire monomérique (RF) fermée.

Cette molécule intermédiaire peut être le substrat pour un clivage spécifique par la NS1 (Nüesch *et al.*, 1995), qui réouvre la molécule à un point situé 18 nucléotides en amont de la fin originale de l'extrémité 5'. L'extrémité 3' de la brisure peut donc être allongée, tout en déplaçant l'épingle à cheveux terminale, et se replier sur elle-même de telle sorte qu'un dimère de la molécule RF originale est produit. Le transfert de l'épingle à cheveux à l'extrémité 5' du brin négatif peut résulter en deux séquences alternatives, l'une étant l'inverse complémentaire de l'autre ("flip" et "flop"). Le brin viral est, concurremment à la synthèse, excisé de la forme répliquative et encapsidé, à partir de l'extrémité 5', dans le virion naissant. La NS1 demeure attachée au génome viral, à l'extérieur de la capsid, et est souvent enlevée juste avant ou durant l'infection.

Enfin, on n'a pas encore déterminé l'influence des processus cellulaires ou des produits de gènes viraux sur la lyse des cellules infectées et le relargage des virus de progéniture.

2. LE PARVOVIRUS PORCIN (PPV)

2.1 Introduction

Le parvovirus porcin (PPV) est un parvovirus autonome dont les propriétés physico-chimiques et les séquences génomiques ressemblent à celles des parvovirus de

rongeurs MVM et H-1, du virus de l'entérite du vison (MEV), du parvovirus canin (CPV) et du virus de la panleucopénie féline (FPV) (Cotmore et Tattersall, 1987; Tijssen et Bergeron, 1994).

Lorsqu'en 1965, Dunne et collaborateurs attribuèrent l'acronyme SMEDI ("stillbirth, mummified foetuses, early embryonic death, infertility") à un syndrome d'infertilité rencontré chez le porc, les auteurs suspectaient la présence d'un picornavirus. Il fut démontré par la suite qu'un parvovirus en était le principal responsable (Mengeling et Cutlip, 1976). Les manifestations cliniques d'une infection au PPV englobent la mort précoce de l'embryon, la perte de gestation, la momification du fœtus, des morts-nés, des portées réduites et des avortements (revue par Molitor et Joo, 1990). Règle générale, cette infection ne cause pas de pathologies évidentes chez l'adulte ou le jeune porc. Cependant, le PPV a été associé à des cas graves de dermatite chez des porcelets (Kresse *et al.*, 1985), et des virus semblables au PPV ont été impliqués dans des cas de diarrhée porcine (Dea *et al.*, 1985; Yasuhara *et al.*, 1989 et 1993).

Suite à une exposition naturelle ou expérimentale au PPV, une virémie se développe chez l'animal séronégatif. Cette dernière semble être un prérequis pour que le virus traverse le placenta de la truie gestante et subséquemment infecte les embryons ou les fœtus. Les isolats avirulents de PPV (e.g., NADL-2) ne réussissent pas à

traverser la barrière placentaire du fait de leur incapacité à induire une virémie rapide et prolongée (Lenghaus *et al.*, 1978; Paul et Mengeling, 1984).

2.2 Différents isolats de PPV

Des isolats de PPV ont été recouverts d'une grande variété de sources, incluant des leucocytes normaux de porc, des foetus momifiés, des tissus respiratoires porcins, de la semence de verrat, de lésions de dermatite de porcelets, des fèces de porcs diarrhéiques, ainsi que comme contaminants de cultures cellulaires ou de stocks de virus (revue par Molitor et Joo, 1990).

2.2.1 Propriétés antigéniques

Des antisérums spécifiques à certains PPV choisis ont été utilisés afin de comparer les isolats par hémagglutination (HA), inhibition de l'hémagglutination (IHA), neutralisation virale (NV), immunoprécipitation (IP), ainsi que par immunofluorescence directe (IF) et indirecte (IFI) (revue par Molitor et Joo, 1990). Aucune différence antigénique n'a été détectée par HA. Pas plus de différence, en terme de réactivité sérologique, n'a été démontrée par NV, IHA, IP, et IFI utilisant des antisérums homologues ou hétérologues. Seuls les isolats entériques japonais ont montré des différences antigéniques; mais il n'est pas du tout certain que ces souches soient de véritables PPV.

2.2.2 Propriétés pathogéniques

Malgré cette homogénéité antigénique des différents isolats de PPV, des souches peuvent être distinguées par leur pathogénicité différenciée (Tableau 2). La souche non pathogène NADL-2, couramment utilisée comme vaccin inactivé, cause une virémie limitée et, lors d'infections expérimentales, ne traverse pas la barrière placentaire (Paul et Mengeling, 1980). À l'opposé, les souches virulentes isolées de foetus momifiés, telle NADL-8, provoquent une virémie, traversent le placenta et infectent mortellement les foetus non immunocompétents (Mengeling et Cutlip, 1975). Même si la souche NADL-2 est sans danger lorsque administrée oralement, elle provoque la mort foetale quand elle est injectée *in utero* dans les liquides extrafoetaux (Cutlip et Mengeling, 1975). Cependant, Mengeling et collaborateurs (1984) ont observé que, après inoculation expérimentale dans le liquide amniotique de truies gestantes, la souche NADL-8 était infectieuse et létale à des dilutions beaucoup plus grandes que la souche NADL-2 (de l'ordre de 10,000 fois). Enfin, d'autres souches virulentes de PPV, telle la souche Kresse, ont été associées à des dermatites sévères (Kresse *et al.*, 1985). Ces dernières démontrent une virulence encore plus grande et tuent le foetus, même immunocompétent (Choi *et al.*, 1987).

Tableau 2

Pathogénicité, chez le porc, de quatre isolats de parvovirus porcin.

Isolat	Source originale	Transmission placentaire	Mort foetale suivant l'infection expérimentale			
			<i>per os</i>		<i>in utero</i>	
			< 10 semaines	> 10 semaines ^a	< 10 semaines	> 10 semaines
KBSH	Cellules KB normales	Non	Non	Non	Non	Non
NADL-2	Leucocytes normaux	Non	Non	Non	Oui	Non
NADL-8	Foetus momifiés	Oui	Oui	Non	Oui	Non ^b
Kresse	Vésicules (dermatite)	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui ^b

Adapté de Molitor et Joo, 1990

^a Les foetus âgés de plus de 70 jours sont normalement immunocompétents.

^b Concentrations relatives d'ADN répliatif dans les organes de foetus infectés de Kresse comparativement aux foetus infectés avec NADL-8 (Oraveerakul *et al.*, 1993):

foie, poumon et coeur: de 1 à 3 fois plus,
rein et tractus gastro-intestinal: presque 10 fois plus,
cerveau et rate: environ 30 fois plus.

2.2.3 Pathogénicité et réponse immunitaire

Comparativement aux souches pathogènes communes, telle NADL-8, la virulence accrue de la souche Kresse envers le fœtus peut être attribuable à un niveau plus élevé de réplication (Kresse *et al.*, 1985; Choi *et al.*, 1987), de sorte que la réponse immunitaire de l'hôte devient insuffisante pour éliminer le virus.

De plus, la présence de dépôts de complexes-immuns, dans les tissus de fœtus inoculés de Kresse, pourrait indiquer que les lésions observées sont le résultat d'une pathologie immune (Oraveerakul *et al.*, 1993). Ce type de pathologie est bien connue chez le vison infecté par le parvovirus ADV et clairement suspectée chez l'humain. Suite à l'infection par le parvo B 19 et après la phase de réplication virale, une éruption cutanée apparaît concurremment à une réponse immunitaire détectable (Pattison, 1990). Même si la dermatite observée chez les porcelets semble reliée davantage à une réaction immunitaire qu'à un tropisme spécifique de la souche Kresse pour les cellules de la peau, il n'en demeure pas moins que cette différence biologique avec les autres souches pathogènes doit résider dans la constitution génétique du virus (Tijssen *et al.*, 1995).

À l'opposé de ces différences de souches bien documentées, Lager et collaborateurs (1992) ont rapporté une virulence accrue de NADL-8 comparée à la souche Kresse lors de l'infection expérimentale de fœtus immunocompétents. Ils

expliquèrent cette contradiction en s'appuyant sur les différentes routes utilisées pour administrer le virus aux foetus. Ayant opté pour l'injection intra-amniotique plutôt que sous-cutanée (Choi *et al.*, 1987), les auteurs associèrent la virulence de la souche Kresse à son isolement de lésions de dermatite et conclurent que le virus devait être plus pathogène lors d'injection sous-cutanée. Même si la voie d'infection peut jouer un rôle, un tropisme spécifique pour les cellules de la peau ne peut expliquer les résultats de Oraveerakul et collaborateurs (1993) qui eux, utilisèrent l'injection intra-musculaire du virus Kresse dans les foetus.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a été faite sur la réponse à médiation cellulaire induite par le PPV. Or, il devient de plus en plus évident que le type de réponse (T_h1 versus T_h2) influence grandement la pathogénèse de différents virus et l'aboutissement éventuel de la maladie (Clerici et Shearer, 1993 et 1994)². Il peut être postulé que l'infection due à différentes souches de PPV modulerait une réponse différentielle chez le porc (Tijssen *et al.*, 1995). Par exemple, l'infection par la souche Kresse pourrait induire un "switch" de T_h1 vers T_h2 , réduisant ainsi la réponse à médiation cellulaire et

²Les cellules T auxiliaires (T_{helper}) sont des lymphocytes jouant un rôle déterminant dans le développement des réponses immunitaires. Ces cellules se subdivisent en 2 sous-populations en regard des cytokines (modulateurs chimiques) qu'elles sécrètent. Les T_h1 produisent l'interleukine-2, l'interféron gamma et favorisent les réponses à médiation cellulaire; alors que les T_h2 sécrètent les interleukines 4, 5, 6, 10 et influencent le développement des cellules B responsables de la réponse humorale (production d'anticorps). Une fois établi, chaque profil de réponse tend à supprimer le profil opposé. En effet, l'interféron γ des cellules T_h1 inhibe la prolifération des T_h2 , tandis que l'interleukine-10 des cellules T_h2 bloque la production des modulateurs propres aux T_h1 .

augmentant plutôt les manifestations propres aux cellules B comme l'hypergamma-globulinémie. Donc, la souche virale tout comme la dose ou la voie d'infection pourraient expliquer les variations de la pathogénicité.

3. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DU PPV

Comme beaucoup d'autres parvovirus autonomes, le PPV encapside presque exclusivement le brin "-" d'ADN. On n'observe que très peu de différences au niveau des cartes de restriction des souches les mieux étudiées: KBSH, NADL-8, NADL-2 et Kresse. Un site supplémentaire *MspI* ou *NsiI* a respectivement été identifié chez KBSH et NADL-2 (Molitor *et al.*, 1984). Le séquençage de NADL-2 (Ranz *et al.*, 1989; Vasudevacharya *et al.*, 1990; Bergeron *et al.*, 1993), 90HS (Sakurai *et al.*, 1989) et Kresse (Bergeron *et al.*, 1996) a confirmé que les déterminants génomiques responsables des différences de pathogénicité de ces souches sont très subtils.

L'organisation génomique du PPV (Figure 1) ressemble à celles de MVM et H-1, mais plus particulièrement, à cause des sites d'épissage, à celles de CPV, MEV et FPV. Cette figure montre que le génome est organisé en deux grands et deux petits ORF (cadres ouverts de lecture). Les ORF de gauche, grand et petit, codent vraisemblablement trois protéines non-structurales (NS); alors que les ORF de droite, petit et grand, codent deux protéines structurales (VP). Une protéase cellulaire génère une troisième VP par l'excision d'un fragment de 4 kDa à l'extrémité N-terminale de la VP-2.

Figure 1

(A) Transformation de l'information génomique aux protéines virales (Bergeron *et al.*, 1993). La région codante couvre 4 ORF: deux grands et deux petits. Le premier petit cadre ouvert se trouve immédiatement en aval du premier grand ORF et code pour la portion N-terminale de la VP-1, de même que pour la portion C-terminale de la NS-3. Le second petit ORF, présent sur le troisième cadre de lecture, coïncide avec le promoteur P40 et code pour le C-terminus de la NS-2. Les transcrits sont synthétisés à partir des nt 225 et 2035 du brin "-" et polyadénylés à la position 4833. On distingue 4 différents patrons d'épissage (A: 2281/2388, B: 2314/2388, C: 548/2021, D: 548/2388) résultant en transcrits de 4,7 kb (R1), 3,3 kb (R2) et 2,9 kb (R3 et R4). La superposition des ORF aux transcrits prédisait, après traduction, 3 NS et 2 VP (les numéros correspondent au premier et au dernier nt de chaque exon, alors que les chiffres à l'intérieur ou près des encadrés réfèrent aux cadres de lecture). Le fragment *BgIII-BgIII* des VP-1/2 contenant les acides aminés 378D, 383H et 436S (numérotation selon VP-2) est aussi illustré. Les chiffres romains au-dessus du produit de transcription NS-1 indiquent des régions présentant des motifs de protéine initiatrice (I) et des motifs de la superfamille III des hélicases (II).

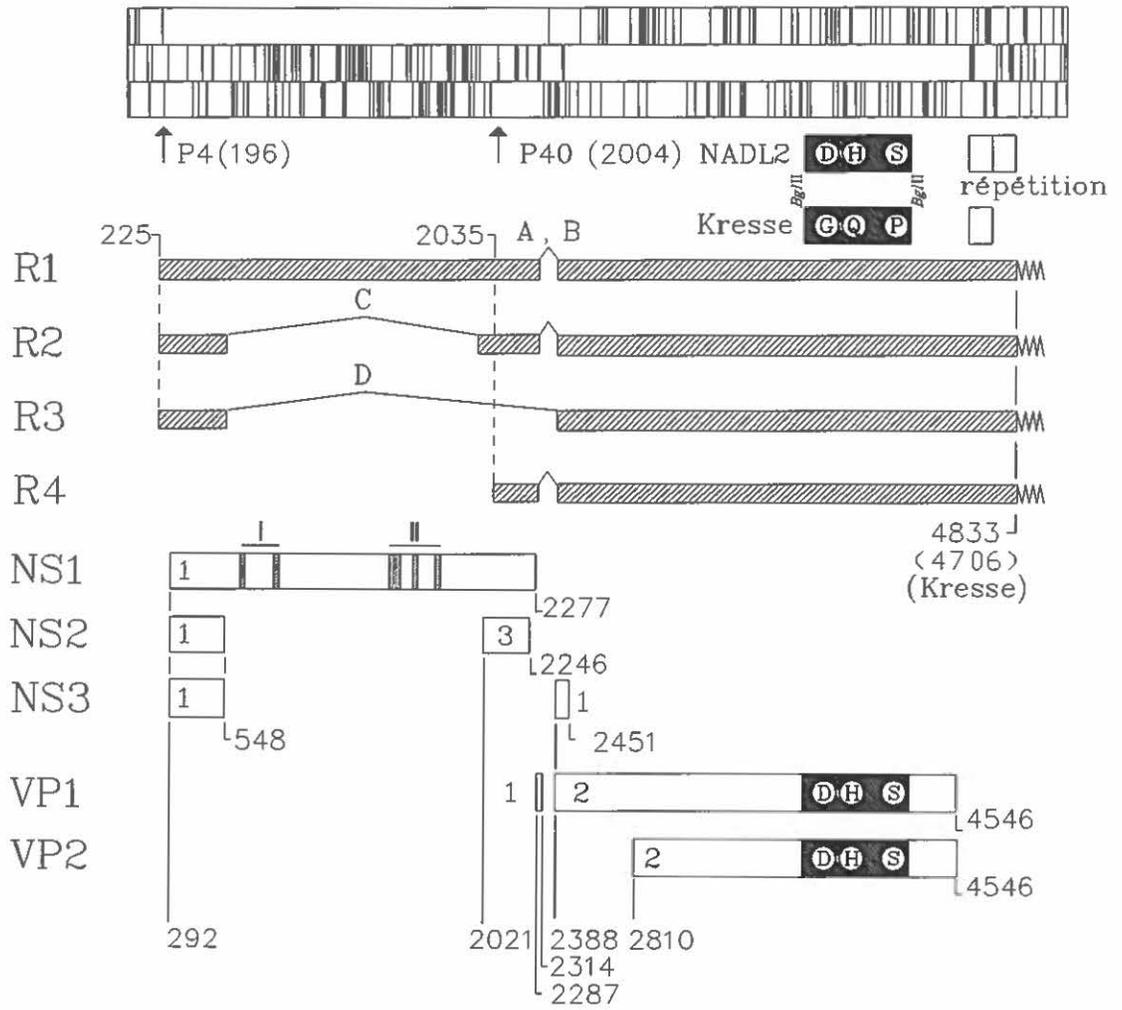
(B) Différence d'épissage des protéines VP et NS entre PPV et MVM.

- En regard des protéines structurales, MVM a deux sites accepteurs d'épissage dans l'ORF de droite, alors que le PPV n'en a qu'un. Cependant, cette différence n'affecte pas la stratégie d'expression, tel que démontré par les régions traduites (ligne grasse, VP-1; double ligne grasse, VP-2).

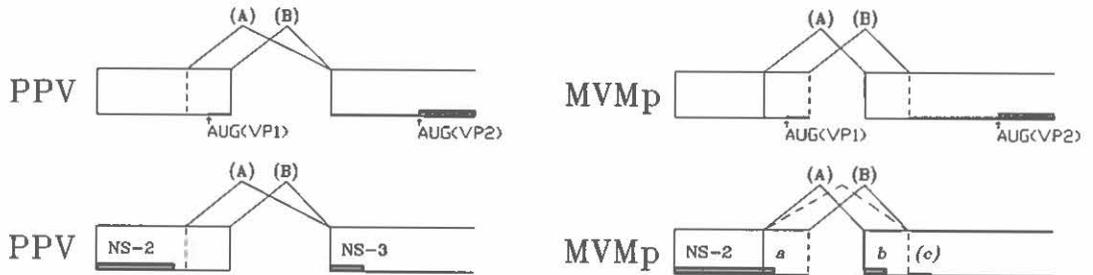
- La stratégie d'expression de la NS-2 diffère considérablement entre PPV et MVM. Pour MVM, la NS-2 peut présenter différentes extensions en C-terminal (a, b, et quoique rarement, c). À l'opposé, la NS-2 du PPV se termine en amont des sites d'épissage des VP et une NS-3 distincte est générée par épissage du site donneur de la NS-2 (à 547-CG/GC) au site accepteur de la VP.

A

Brin "+" de l'ADN du PPV



B



3.1 Rôle des séquences non codantes

Le génome très compact de cinq kb des PPV exige une utilisation économique de l'information génétique afin de médier leurs réplifications différentielles dans les cellules. Les séquences régulatrices et autres séquences non codantes impliquées dans la répllication, la transcription ou l'encapsidation du virus se retrouvent aux deux extrémités du génome, mais recouvrent aussi les séquences codantes. Les deux bouts du génome viral peuvent se replier sous forme d'épingle à cheveux. A l'extrémité 3' (gauche) du génome monocaténaire, la séquence permet un repliement en Y du palindrome de 117 nucléotides, qui peut dès lors servir d'amorce durant le stage initial de la répllication (génération d'un ADN double-brin nécessaire à la transcription). Ce palindrome partage avec d'autres parvovirus la présence d'un appariement imparfait ou bulle. On a montré récemment que celle-ci était importante pour la fixation sélective du facteur de transcription USF au bras interne du Y, alors que le facteur de modulation positive NF-Y se fixe aux deux bras, juste à l'extérieur de la bulle (Gu *et al.*, 1995). Cette bulle est aussi impliquée dans la ségrégation de l'origine de répllication (Cotmore et Tattersall, 1994). À l'autre bout du génome, l'épingle à cheveux en 5' (200 nt) joue un rôle crucial dans la répllication virale par son implication dans le mécanisme "d'épingle à cheveux roulante" d'où résultent deux séquences alternatives de 44 nt à l'intérieur de l'épingle ("flip" et son complémentaire inverse "flop"). Puisque les souches Kresse et NADL-2 partagent des séquences identiques aux deux extrémités, il

ne semble pas que celles-ci soient responsables des différences de pathogénicité.

Une répétition de 127 pb se retrouve dans la région non codante de NADL-2, et débute juste avant le codon d'arrêt de l'ORF droit. À l'opposé, la souche Kresse, comme toutes les souches pathogènes étudiées à ce jour, ne présente pas cette répétition. Le rôle exact de ce tandem n'est pas clair. Chacune des répétitions reprend quatre fois le motif AATAAA et aucun n'est fonctionnel (le seul signal de polyadénylation fonctionnel se trouve 20 nt en aval de la répétition). Ces répétitions sont très riches en AT et peuvent avoir un effet négatif sur la stabilité des transcrits (Sachs, 1993). Une situation similaire au PPV existe chez MVM où la souche virémique MVMi n'a pas la répétition de 65 pb présente chez MVMp (Astell *et al.*, 1986). Cependant, des études *in vitro* ont démontré que l'élimination de la répétition de 65 pb chez MVMp inhibait la réplication de 10 à 100 fois, dépendant de la cellule hôte (Salvino *et al.*, 1991).

La transcription virale est sous le contrôle de deux promoteurs: TATA₁₉₆ dirige la synthèse des ARNm pour les protéines NS, et TATA₂₀₀₄ celle des protéines VP. Même s'il a été rapporté que, pour PPV, une certaine expression était obtenue du promoteur P40 (\approx 2004) mais non du promoteur P4 (\approx 196) dans des cellules non permissives (Oraveerakul *et al.*, 1992), il est généralement admis que P40 est transactivé par la protéine NS1 générée à partir de P4. On trouve deux éléments de contrôle en amont de TATA₂₀₀₄: (i) une séquence "enabler" à la position 1949 (idem

chez CPV); et (ii), un élément de transactivation "tar" à 120 nt plus avant (idem chez le parvovirus H-1) (Gu *et al.*, 1992). Aucune différence n'a été observée à ce niveau entre les souches pathogènes et non pathogènes de PPV.

3.2 Transcrits, épissage et protéines produites

Parmi les parvovirus autonomes, la stratégie employée pour l'épissage différencie le groupe formé de PPV, CPV, MEV et FPV de celui composé de MVM et H-1. On a observé pour PPV-NADL-2 trois bandes majeures après hybridation de type "Northern", correspondant à 4,7, 3,3 et 2,9 kb. Deux différentes extrémités 5' (positions 225 et 2035) débutent ces transcrits (Figure 1: Bergeron *et al.*, 1993). Tous les transcrits épissés se terminent au nucléotide 4833 dans le cas du NADL-2 et 4706 (absence de la répétition de 127 pb) pour la souche Kresse. Comme pour les autres virus du même groupe, le transcrit entier de 4,7 kb (R1) code pour la protéine NS1.

Deux petits introns (A et B, dans la Figure 1A) se chevauchant, et pouvant être épissés de façon alternative, jouent un rôle déterminant dans l'expression des protéines. Leur localisation en regard des codons d'arrêt des protéines NS est cruciale. Deux sites donneurs (2280 et 2313) sont donc alternativement épissés au même site accepteur (2386). Le premier site donneur est situé en aval des codons d'arrêt de NS1 et NS2. Au contraire, MVM utilise deux sites accepteurs et le codon d'arrêt de la NS2 se situe entre

les sites donneurs. Conséquemment, avec un épissage de type A (figure 1B), la NS2 de MVM obtient une séquence C-terminale différente qu'avec un épissage de type B. La NS2 de PPV n'a pas cette hétérogénéité; mais ceci semble être compensé par l'épissage du transcrit R3 produisant la NS3.

Ces petits introns déterminent aussi quelle VP sera synthétisée à partir du transcrit R4. Le codon d'initiation de la VP1 (ATG-2287) est éliminé par l'épissage de type A. Ceci force l'utilisation du prochain codon ATG (2810) pour la synthèse de la VP2. Par contre, l'épissage de type B préserve le premier codon d'initiation et génère la VP1.

L'épissage des ARN messagers de la souche Kresse démontre une stratégie identique à celle utilisée par la souche NADL-2 (Tijssen *et al.*, 1995). De plus, tous les isolats séquencés à ce jour démontrent une identité parfaite au niveau des sites donneurs et accepteurs, de même que du voisinage de ces sites. Ceci exclue donc une influence possible en regard des pathogénicités variées des souches de PPV.

3.3 Fonctions des protéines non-structurales

On connaît peu quant aux fonctions des protéines non-structurales du PPV. Contrairement aux protéines de la capsid, la NS1 partage une grande homologie de

séquence avec des protéines similaires présentes chez beaucoup d'autres parvovirus (environ 85% vs 70% ou moins pour les VP). On peut donc postuler que plusieurs fonctions de ces omniprésentes protéines NS soient similaires. Tijssen et Bergoin (1995) ont identifié, sur la NS1, des motifs de séquence appartenant à la superfamille III des hélicases et d'autres relatifs aux protéines initiatrices. Ces fonctions pourraient bien être impliquées dans le mécanisme réplcatif de "l'épingle à cheveux roulante". De plus, par son interaction avec le facteur de transcription Sp1, la NS1 est aussi un important régulateur/trans-activateur de l'expression virale (Kradý et Ward, 1995). Enfin, la NS1 participe, au cours de la réplication, à la résolution des intermédiaires réplcatifs et se fixe aux extrémités 5' de l'ADN du duplex et de la progéniture (Cotmore et Tattersall, 1989; Liu *et al.*, 1994).

Les formes alternatives de la NS2 de MVM ont des localisations et des demi-vies radicalement différentes (Cotmore et Tattersall, 1990). Des mutations à son niveau affectent fortement l'efficacité de la production virale, à la manière d'un tropisme cellulaire (Naeger *et al.*, 1990). De plus, la NS2 du parvovirus H-1 est nécessaire à la synthèse efficace des protéines, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Li et Rhode, 1991). À ce jour, la NS2 du PPV n'a pas été étudiée.

Même s'il a été rapporté que le tropisme du PPV puisse être affecté par des séquences de la portion NS (Vasudevacharya et Compans, 1992), aucune différence

dans cette région n'a été relevée entre les séquences de NADL-2 et Kresse (Bergeron *et al.*, 1996). Les variations de tropisme et de pathogénicité entre ces souches semblent donc résider au niveau de la capsid.

4. TROPISME ET BARRIÈRES D'HÔTES

4.1 Importance des protéines structurales

Chez les parvovirus, tous les déterminants relatifs aux tropismes cellulaire ou tissulaire, aux barrières d'hôtes, de même qu'aux propriétés hémagglutinantes, ont été localisés à l'intérieur des protéines de la capsid (Bergeron *et al.*, 1996; Vasudevacharya et Compans, 1992; Parrish, 1991; Chang *et al.*, 1992; Parrish *et al.*, 1988; Truyen et Parrish, 1992). Ainsi, chez MVM, les fibroblastes sont permissifs à MVMp, alors que les cellules T murines sont permissives à MVMi. Chacune des souches ne peut pousser que sur ses cellules hôtes (McMaster *et al.*, 1981). Deux modifications seulement, de la séquence en acides aminés de VP1/VP2, permettent au MVMi lymphotropique de pousser sur fibroblastes comme MVMp (Gardiner et Tattersall, 1988; Ball-Goodrich et Tattersall, 1992). La réplication de l'ADV est aussi contrôlée par un déterminant localisé sur la séquence commune de VP1/VP2 (Bloom *et al.*, 1993).

L'identité quasi parfaite (99%) entre les souches Kresse et NADL-2 implique que toute variation dans le tropisme doit correspondre à des différences génomiques mineures (Tableau 3). Kresse et NADL-2 ne diffèrent que par cinq acides aminés, tous localisés à l'intérieur de la région codant pour la protéine structurale VP2 (Bergeron *et al.*, 1996). Ces auteurs ont identifié plus précisément un fragment de restriction (*Bgl*III) qui, interchangé d'un génome à l'autre, transfère les tropismes cellulaires respectifs à chacune des souches (Figure 1). Le fragment délimité par les sites de restriction *Bgl*III contient le déterminant allotropique: on n'y trouve aucune mutation silencieuse en plus de la substitution des trois acides aminés.

4.2 Structures conservées dans les capsides de parvovirus

Les séquences des protéines de capsid de dix parvovirus, comparées aux coordonnées obtenues par cristallographie aux rayons X du CPV, révèlent des motifs communs (Tsao *et al.*, 1991; Chapman et Rossmann, 1993). La localisation des différents déterminants du CPV sur la structure générale du virion indique que les résidus critiques sont majoritairement positionnés à la surface extérieure de la capsid (Chang *et al.*, 1992). Comme le CPV et le PPV partagent, pour les protéines de la capsid, une homologie de séquences en acides aminés de l'ordre de 60%, les deux séquences peuvent être alignées et comparées afin de prédire l'emplacement des résidus critiques de la VP2 du PPV dans une structure tridimensionnelle.

Tableau 3

Mutations génomiques observées et modifications anticipées des acides aminés, au niveau de la VP-2 de différents isolats et souches de PPV (Bergeron *et al.*, 1993 et 1996). Les numéros indiquent, soit la position dans la séquence du brin "+" du PPV NADL-2, soit la position dans la séquence en acides aminés de la VP-2. Les mutations constantes sont indiquées sur fond noir. Tous les cas cliniques provenaient de foetus momifiés, sauf IAF-A54 et IAF-22 qui ont été isolés respectivement de lésions de dermatite et de la glande thyroïde d'un porc normal. (nt: non testé).

Position dans séq. NADL-2	NADL-2	IAF-3	Kresse	IAF-A54	90HS	IAF-22	IAF-28	IAF-76	Position dans séq. VP2	NADL-2	IAF-3	Kresse	IAF-A54	90HS	IAF-22	IAF-28	IAF-76
3358	AGT	---	---	---	---	--C	nt	nt	192	S	-	-	-	-	-	nt	nt
3453	ATC	---	-C-	-C-	-C-	-C-	nt	nt	215	I	-	T	T	T	T	nt	nt
3710	GGA	--T	---	---	---	---	nt	nt	300	G	-	-	-	-	-	nt	nt
3769	ATT	---	---	---	---G	---	---	---	320	I	-	-	-	M	-	-	-
3787	GAA	---	---	---	---	---G	---	---	326	E	-	-	-	-	-	-	-
3835	ATG	--C	---	---	---	---	---	---	342	M	T	-	-	-	-	-	-
3884	ACA	---	---	---	---	G--	---	---	359	T	-	-	-	-	A	-	-
3927	ATA	-A-	---	---	---	---	---	---	373	I	K	-	-	-	-	-	-
3942	GAT	---	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	378	D	-	G	G	G	G	G	G
3958	CAC	---	--A	--A	--A	--A	--A	--A	383	H	-	Q	Q	Q	Q	Q	Q
3979	GAG	---	---	---	---	---	---	--A	390	E	-	-	-	-	-	-	-
4108	GGA	---	---	---	---	---	---	--G	433	G	-	-	-	-	-	-	-
4112	AAA	---	---	---	---	---	---	G--	435	K	-	-	-	-	-	-	E
4115	TCT	---	C--	C--	C--	C--	C--	C--	436	S	-	P	P	P	P	P	P
4135	AAT	---	---	---	---	--C	---	---	542	N	-	-	-	-	-	-	-
4209	GAT	---	---	---	---	---	---	-T-	467	D	-	-	-	-	-	-	V
4263	GGT	---	---	---	---	-C-	---	---	485	V	-	-	-	-	A	-	-
4279	CCA	--G	---	---	---	---	---	---	490	P	-	-	-	-	-	-	-
4498	GGC	---	---	---	---	---	--T	---	563	G	-	-	-	-	-	-	-
4503	AGA	---	-A-	-A-	-A-	-A-	-A-	-A-	565	R	-	K	K	K	K	K	K
4540	AAA	---	---	---	---	---	---	--T	576	K	-	-	-	-	-	-	N

Répétition +

- - - - -

(2 x 127 nucléotides)

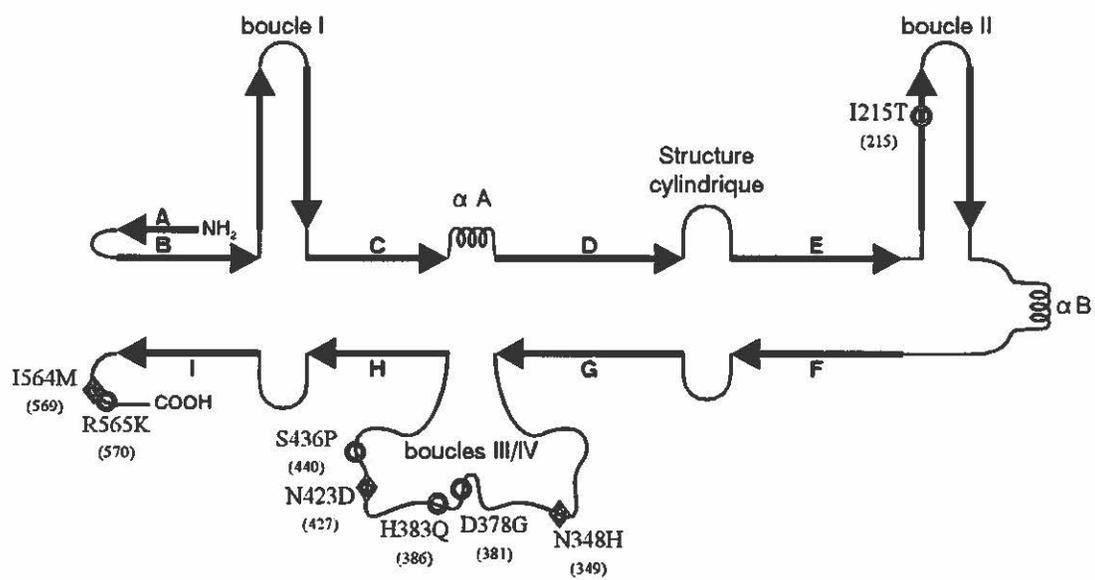
Tijssen et collaborateurs (1995) suggèrent que la structure cylindrique chapeautant l'axe de symétrie d'ordre cinq, le renflement entre les feuillets β F et β G, de même que les derniers 25% de la boucle IV (Figure 2), sont probablement les régions fonctionnellement les plus significatives. La région de la structure cylindrique, grandement conservée entre CPV et PPV, est possiblement responsable de la stabilisation structurale autour de l'axe de symétrie. Les résidus formant le renflement entre β F et β G sont directement impliqués dans l'interaction avec l'ADN viral (Chapman et Rossmann, 1995). Enfin, les cinquante derniers acides aminés de la boucle IV, juste avant β H, sont largement conservés entre CPV et PPV. Cette portion de la boucle est interne et adjacente à l'axe de symétrie d'ordre trois, qu'elle doit probablement stabiliser, quoique l'ensemble de cette structure puisse être très flexible (Tijssen *et al.*, 1995).

4.3 Cartographie des résidus impliqués dans le tropisme du PPV

Les cinq acides aminés différents entre les souches Kresse et NADL-2 se retrouvent tous sur les boucles extérieures reliant entre eux les feuillets β de la VP2. Ces résidus sont localisés sur la boucle II pour I215T, sur la boucle III/IV pour D378G, H383Q, S436P, et sur l'extrémité COOH pour R565K (Figure 2). Quatre d'entre eux se retrouveraient à la surface de la capsid du CPV, alors que le cinquième (D378G) serait près de la surface. Des quatre résidus très accessibles, S436P est le plus exposé,

Figure 2

Localisation des résidus critiques du PPV sur la structure secondaire du CPV. Les principaux feuillets β (A à I) et les hélices α (αA et αB) sont représentés respectivement sous forme de flèches et d'enroulements (adapté de Chapman et Rossmann, 1993). Les différences entre NADL-2 et Kresse sont indiquées par des cercles, alors que les losanges correspondent au variant P2 du PPV (Vasudevacharya et Compans, 1992). Les nombres entre parenthèses réfèrent aux résidus correspondants du CPV.



étant situé au sommet de l'axe de symétrie d'ordre trois (Figure 3). Ce dernier pourrait être déterminant dans le tropisme du PPV. En plus, la substitution d'une sérine par une proline à la position 436 résulte probablement en une modification considérable de la topographie locale, étant donné les restrictions imposées par sa nature acide iminé (Tijssen *et al.*, 1995). Enfin, les chimères contenant ce résidu, de même que 378 et 383, ont pu intervertir les phénotypes des souches Kresse et NADL-2 (Bergeron *et al.* 1996).

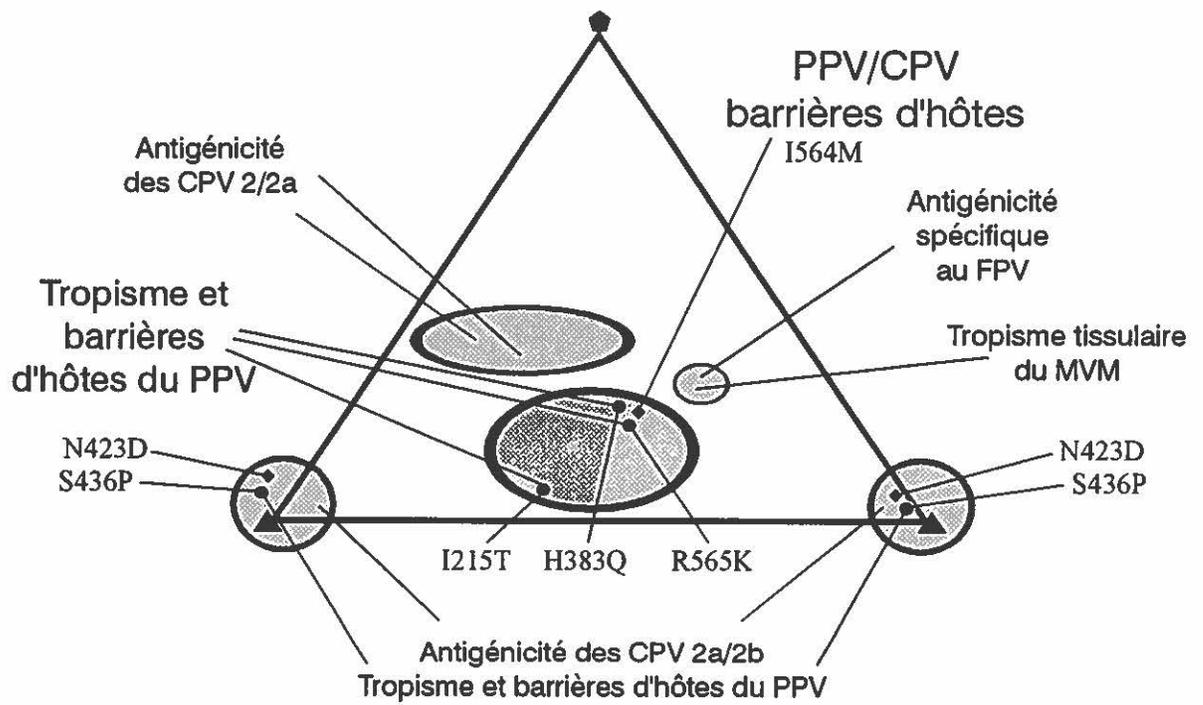
D'autres résidus accessibles peuvent être alternativement ou conjointement impliqués dans les barrières d'hôtes. Le variant P2 de PPV (Vasudevacharya et Compans, 1992) présente, au niveau de la VP2, des modifications qui sont localisées structurellement très près de celles observées entre Kresse et NADL-2.

4.4 Rôle du déterminant allotropique

Le tropisme du PPV a été évalué *in vivo* (tissus) et *in vitro* (culture cellulaire) (Bergeron *et al.*, 1996; Oraveerakul *et al.*, 1993). L'attachement et l'entrée du PPV surviennent à la fois dans les cellules permissives et non permissives, tel que démontré par immunofluorescence et cytométrie en flux (Ridpath et Mengeling, 1988). Il n'y a pas de corrélation systématique entre la distribution de récepteurs viraux et la permissivité observée; quoique l'absence de telles molécules exclue l'infection. Par exemple, les cellules ne possédant pas le récepteur globoside pour B19 sont non permissives à ce virus (Gallinella *et al.*, 1995).

Figure 3

Représentation schématique d'une unité asymétrique de la capsid du PPV (1/60 du virus ayant un $T = 1$), adaptée de la structure tridimensionnelle du CPV (Tsao *et al.*, 1991). L'axe de symétrie d'ordre cinq est représenté par un pentagone et les deux axes d'ordre trois par des triangles. À noter que les substitutions d'acides aminés critiques entre PPV NADL-2 et Kresse sont localisées dans des zones différentes de celles identifiées chez d'autres parvovirus, mais qu'elles se retrouvent tout de même nettement exposées. Comparativement à la souche de référence NADL-2, les cercles correspondent à des substitutions typiques de Kresse et les losanges à celles du variant P2.



De plus, un récepteur putatif pour le PPV, similaire en poids moléculaire à celui identifié pour le CPV, a été trouvé à la fois dans des cellules permissives et non permissives (Harding et Molitor, 1992). On n'a pas démontré de réactivité croisée entre ces deux récepteurs quoique, dans certains cas, le PPV peut pénétrer dans des cellules permissives au CPV, mais non au PPV (Vasudevacharya et Compans, 1992). Ceci renforce l'idée que la permissivité est sous le contrôle intra-cellulaire.

5. DIAGNOSTIC ET PRÉVENTION

Les infections au PPV sont enzootiques dans la plupart des troupeaux, et la majorité des porcs adultes ont développé une immunité au virus (Molitor et Joo, 1990). Les jeunes animaux, cependant, peuvent ne pas être protégés. C'est pourquoi la vaccination avant l'accouplement est devenue pratique courante. Des vaccins vivants, atténués par passages successifs sur cultures cellulaires, ou des souches avirulentes inactivées chimiquement (e.g., NADL-2) sont largement utilisés. Même si ces vaccins sont apparemment efficaces, on peut leur reprocher deux inconvénients majeurs. Premièrement, il est coûteux de propager le PPV en cultures cellulaires de façon à produire une masse immunogénique suffisante. Deuxièmement, l'introduction possible de mutations, même légères, peut avoir un impact très lourd sur le tropisme ou la barrière d'hôtes du PPV. Par exemple, la souche IAF-3 isolée d'un foetus momifié semble être un PPV de type NADL-2 ayant perdu une répétition (Tableau 3).

Récemment, le gène codant pour la VP2 du PPV a été exprimé, via le système baculovirus, dans des cellules d'insecte (Martinez *et al.*, 1992). Les protéines produites ont spontanément formé des capsides, et les porcs immunisés avec celles-ci ont développé une immunité identique à celle produite par un vaccin commercial. Des études portant sur des capsides chimériques de parvo B19 ont démontré la possibilité d'ajouter des épitopes étrangers à la surface de ces imitations de virus (Brown *et al.*, 1994). Des vaccins synthétiques multivalents seraient donc réalisables.

Considérant les différences de pathogénicité frappantes entre les souches de PPV, de même que les risques potentiels des vaccins utilisés présentement; il apparaît important que les laboratoires de diagnostic puissent distinguer les souches, plutôt que de simplement identifier la présence du virus. La gestion efficace des troupeaux, comme la fiabilité des études épidémiologiques, y gagneraient certainement. Les méthodes classiques de diagnostic basées sur la réactivité sérologique envers des sérums polyclonaux, tout comme les techniques plus récentes, telles l'ELISA ou la PCR "de base" (Jenkins, 1992; Molitor *et al.*, 1991), ne sont guère utiles à cet égard.

II° PARTIE : LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)

6. PCR ET DIAGNOSTIC

6.1 *Historique et principe*

La réaction de polymérisation en chaîne a été décrite pour la première fois, en 1985, par Saiki et collaborateurs. La deuxième découverte critique relativement à cette technique a été la purification et l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, celle de *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988). Cette ingénieuse méthode a eu, en recherche bio-moléculaire, un impact sans doute comparable au développement de la technologie de l'ADN recombinant dans les années 70. Sa découverte valut d'ailleurs à Kary B. Mullis l'obtention du prix Nobel de chimie en 1993 (conjointement à Michael Smith, pour ses travaux sur la mutagenèse dirigée). De façon symbolique, l'intérêt manifesté envers la PCR a suivi une courbe d'allure exponentielle. En 1985 et 1986, on ne trouvait qu'un article sur ce sujet dans la banque américaine de données Medline. Chaque année subséquente vit un accroissement à 4, 7, 337, 2046, pour atteindre 4436 articles en 1991 (Myerson, 1992).

Essentiellement, cette technique permet d'amplifier en quelques heures - ou en d'autres termes, de recopier en plusieurs milliers d'exemplaires - un segment d'ADN d'intérêt. Règle générale, ce fragment d'ADN est bordé à chaque extrémité par une suite de nucléotides de séquence connue. Dans des conditions appropriées, deux courtes amorces, complémentaires aux séquences de bout délimitant l'ADN cible, pourront s'hybrider chacune à une extrémité opposée des deux brins de l'acide nucléique. En ajoutant au mélange réactionnel une enzyme polymérase thermostable et des nucléotides, il devient possible à l'enzyme de polymériser, à partir de chacune des amorces, un brin d'ADN complémentaire à chacun des deux brins de la cible. On obtient alors une copie du segment d'ADN à amplifier.

Techniquement, le processus se divise en trois opérations: (1) dénaturation à température élevée du double brin d'ADN cible; (2) hybridation des amorces à l'extrémité opposée de chacun des brins monocaténares; (3) élongation de chacune des amorces par la polymérase, en se servant de ces brins comme gabarits. Ces trois étapes constituent un cycle, et la répétition de ce cycle résulte en l'amplification exponentielle de la séquence d'ADN cible. En effet, si le cycle est répété vingt fois, théoriquement, un million de copies seront générées; un milliard avec trente cycles. Même si dans les faits, le rendement est inférieur, il demeure qu'en quelques heures on peut viser une amplification de 100 000 fois de la séquence d'ADN recherchée.

6.2 Notion d'efficacité

Par définition, la PCR est une réaction en chaîne: les produits obtenus d'un cycle d'amplification servant de substrat pour le cycle suivant. Donc, les produits s'accumulent de façon exponentielle, et non de façon linéaire comme dans la majorité des réactions enzymatiques. Théoriquement, la quantité de produit double à chaque cycle de la PCR, répondant ainsi à l'équation suivante: $N = N_0 2^n$ (où N = le nombre de molécules amplifiées, N_0 = le nombre initial de molécules, et n = le nombre de cycles). Expérimentalement, l'efficacité de l'amplification, c'est-à-dire la fraction de matériel effectivement dupliquée à chaque cycle, n'est pas parfaite (Wang *et al.*, 1989; Chelly *et al.*, 1988; Wiesner, 1992). Le facteur de duplication se situe quelque part entre 1 et 2; puisqu'avec 1, il n'y a pas d'amplification, et qu'avec 2, celle-ci double parfaitement à chaque cycle. Donc, l'équation précédente devient: $N = N_0 (1 + E)^n$, où E = l'efficacité réelle de l'amplification, et se situe entre 0 et 1. À cause de la nature exponentielle de la PCR, une très petite variation de l'efficacité de l'amplification (E) peut occasionner des différences dramatiques au niveau de la quantité finale de molécules produites.

Plusieurs facteurs expérimentaux peuvent affecter l'efficacité de l'amplification: entre autres, la séquence à amplifier, la séquence des amorces, la longueur de l'amplicon et des impuretés dans l'échantillon (Erlich *et al.*, 1991; Arnheim et Erlich, 1992). Les trois premiers facteurs déterminent la présence de structures secondaires et le contenu

en G/C de la cible; lesquels peuvent, à leur tour, interférer avec l'hybridation de l'amorce, affecter le point de fusion de la séquence cible et réduire la "processivité" de la polymérase. La présence d'impuretés dans l'échantillon peut affecter l'efficacité de plusieurs façons. Elles peuvent dégrader ou inhiber la polymérase, causer des changements conformationnels de l'ADN cible ou compétitionner avec les sites d'hybridation des amorces, par exemple.

Enfin, d'autres facteurs plus subtils, et souvent obscurs, peuvent modifier l'efficacité de la PCR. Ceci est particulièrement évident lorsque plusieurs réactions de PCR sont préparées à partir d'une solution-mère unique et soumises à des conditions expérimentales identiques. On observe des variations d'efficacité d'un tube à l'autre aussi significatives qu'imprévisibles (Gilliland *et al.*, 1990; Kellog *et al.*, 1990).

6.3 Effet plateau

La quantité d'amplicons générés par PCR augmente exponentiellement durant les premiers cycles, puis la croissance a tendance à ralentir, pour finalement plafonner lorsque l'accumulation des produits de PCR atteint un seuil critique (de 0,3 à 1 pmol: Innis et Gelfand, 1990). Cette déviation du modèle théorique est communément désignée comme étant l'effet plateau. Plusieurs facteurs contribuent à cet effet. En cours de PCR, les amplicons s'accumulent et atteignent une concentration telle, que les

brins d'ADN se réassocient entre eux plutôt que de s'hybrider aux amorces (Erlich *et al.*, 1991). Le rapport molaire polymérase/ADN tombe en deçà d'un seuil critique. Des inhibiteurs de l'activité enzymatique, tels les pyrophosphates, peuvent s'accumuler. Et finalement, un ou plusieurs composants nécessaires à la réaction finissent par devenir limitants (Innis et Gelfand, 1990).

Le nombre de cycles requis pour atteindre la phase plateau varie selon la séquence et la quantité initiale d'ADN cible (Kellog *et al.*, 1990). Cette variabilité fait qu'il est difficile de prédire exactement la cinétique de la réaction, de même que la quantité d'amplicons produits avant que le plateau ne soit atteint. Durant cette phase, le nombre de molécules produites n'est plus du tout proportionnel à la quantité de départ d'ADN cible. Ces incertitudes inhérentes à l'effet plateau, tout comme la nature exponentielle de la PCR, contribuent à la difficulté de doter la réaction d'une dimension quantitative.

6.4 Limitations de la PCR

La PCR a été largement employée ces dernières années dans divers domaines de la biologie moléculaire, allant de la génétique médicale à la microbiologie et aux sciences légales (revues par Erlich *et al.*, 1991; Arnheim et Erlich, 1992). Les publications décrivant son utilisation dans le diagnostic des maladies infectieuses

s'accumulent à un rythme sans cesse croissant. Cependant, malgré l'enthousiasme entourant la technique, la PCR n'est utilisée de façon routinière, pour le diagnostic clinique, que dans peu de laboratoires (Belak et Ballagi-Pordany, 1993b).

La susceptibilité de la PCR aux résultats faux positifs, dûs à la contamination accidentelle de l'échantillon ou des réactifs, en est la principale raison. Ces faux positifs résultent généralement de l'amplification de la séquence cible présente dans des sources autres que l'échantillon original. Le transport de produits de PCR précédents ("carryover") est, de loin, la cause la plus commune de contamination, précisément à cause du formidable pouvoir d'amplification de la méthode (de 10^6 à 10^{12} fois) (Sarkar et Sommer, 1990). Des vecteurs dans lesquels la séquence cible a été clonée et des contrôles positifs, souvent très forts, sont une autre source de contamination. Enfin, la contamination croisée entre échantillons à tester est aussi possible. On rencontre tous ces problèmes lors d'une réaction simple de PCR, mais leur importance s'accroît exponentiellement si on exécute une double PCR, où des amorces internes sont utilisées. Afin d'éliminer les risques de contamination, les laboratoires doivent utiliser une variété de méthodes et de précautions (revue par Belak et Ballagi-Pordany, 1993b).

À l'inverse, l'amplification par PCR peut aussi faillir pour des raisons techniques. Ces résultats faux négatifs sont généralement moins communs, à cause de l'extrême sensibilité de la méthode. Tel que mentionné à la section 6.2, plusieurs facteurs

expérimentaux peuvent affecter l'efficacité de l'amplification et, à la limite, empêcher toute réaction. De façon générale, un échantillon inadéquat, la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ou un mauvais choix de la séquence cible sont les facteurs les plus susceptibles de perturber la réaction.

6.5 Diagnostic par PCR

Un champ de recherche toujours grandissant utilise la PCR pour identifier les micro-organismes pathogènes. Le principe motivant ces efforts veut que des amorces correctement dessinées permettent l'amplification d'une séquence connue et de longueur déterminée du pathogène, sans amplifier l'ADN de l'hôte ou celui d'un autre micro-organisme. Les séquences spécifiques des amorces peuvent discriminer des différences fines de souches ou de types; et aussi peu qu'une molécule par million de cellules peut être détectée (revue par Wright et Wynford-Thomas, 1990). La PCR peut donc s'avérer un test diagnostique très sensible et très spécifique, particulièrement intéressant pour des pathogènes résistants ou lents à cultiver comme certains mycoplasmes (revue par Rawadi et Dussurget, 1995) ou virus (revues par Mahbubani et Bej, 1994; Belak et Ballagi-Pordany, 1993a). Il serait trop long d'énumérer les différentes publications mentionnant l'utilisation de la PCR en diagnostic humain ou vétérinaire. Les revues de questions précédemment citées en donnent un bref aperçu.

Un tel engouement pour la PCR en diagnostic microbiologique n'est pas étonnant. Les techniques classiques d'isolement requièrent une pléiade de milieux et de conditions de culture, suivie d'une batterie de tests biochimiques pour les bactéries; ou encore la culture cellulaire, l'utilisation d'animaux, et de nombreuses méthodes de détection directe et indirecte pour les virus. Dans les deux cas, l'identification par les techniques de culture peut prendre de plusieurs jours à plusieurs semaines, dépendant de la nature de l'agent infectieux. Même si l'émergence de méthodes diagnostiques basées sur la génétique moléculaire des pathogènes permet d'espérer une détection rapide, plusieurs de celles-ci n'ont pas la sensibilité requise pour une telle détection. Jusqu'à la fin 1988, la plupart de ces techniques moléculaires étaient restreintes à l'analyse de types "Southern" ou "Northern". Les deux types de méthodes sont limités par la quantité importante d'ADN ou d'ARN requis; de un à plusieurs milliers de copies étant nécessaires afin de générer un signal détectable (Mahbubani et Bej, 1994).

Le développement de la PCR et son application au diagnostic des microbes pathogènes a montré, depuis quelques années, son potentiel à changer la pratique du diagnostic clinique dans les laboratoires à travers le monde. Cependant, peu d'études ont été faites quant à la performance et à la fiabilité de la PCR utilisée dans un tel environnement. Les problèmes soulevés par les faux positifs, les faux négatifs et les fluctuations d'efficacité de la réaction ne peuvent être ignorés. En l'absence d'un contrôle rigoureux de sa qualité, l'utilisation diagnostique de la PCR peut devenir très erratique: à preuve, les deux exemples suivants.

Dans l'étude publiée par Hughes en 1990, dix centres situés en Amérique du Nord et en Europe reçurent chacun dix échantillons différents préparés à partir de lignées cellulaires leucémiques. L'analyse par PCR devait déterminer la présence (ou l'absence, dans les cellules témoins) d'un transcrit spécifique. Après compilation générale, seulement 37% des résultats obtenus étaient justes. Sur les 63% erronés, 70% étaient de faux positifs et 30% de faux négatifs. Dans une étude plus récente portant sur la détection par PCR de *Mycobacterium tuberculosis* (Noordhoek *et al.*, 1994), sept laboratoires reconnus dans ce domaine (instituts nationaux et centres universitaires d'Europe, d'Asie et d'Amérique) ont analysé, à l'aveugle, un panel identique comprenant 200 échantillons cliniques de crachats, de salive ou d'eau. Ces échantillons contenaient une quantité connue (ou nulle) de cellules BCG de *Mycobacterium bovis*; la séquence d'insertion IS6110 servant de cible pour l'amplification. Plusieurs des laboratoires participants ont rapporté de hauts niveaux de faux positifs, allant de 3 à 20%; un d'eux déclarant même positifs 77% des échantillons négatifs. Étonnamment, quoique plus de 25 études aient été publiées sur la détection de *M. tuberculosis* (revue par les auteurs), on y trouve que très peu de données quantitatives sur les faux positifs rencontrés. D'un autre côté, le niveau de sensibilité varia aussi grandement d'un établissement à l'autre. Parmi les échantillons contenant 1000 copies de la séquence d'insertion, de 90% à 2% seulement ont été trouvés positifs par PCR, selon les différents laboratoires. Même si la majorité des participants ont inclus des contrôles de sensibilité et de spécificité de la PCR; la séquence des opérations, du pré-traitement de l'échantillon à la purification de

l'ADN bactérien, n'était pas toujours surveillée adéquatement. Durant ces procédures, de l'ADN a été introduit par contamination croisée et inversement, de l'ADN bactérien a été perdu. Finalement, les auteurs conclurent à la nécessité d'implanter un véritable contrôle de la qualité permettant de surveiller la sensibilité et la spécificité de l'analyse avant que la PCR puisse être utilisée de façon fiable pour le diagnostic de la tuberculose.

7. PCR QUANTITATIVE

Au cours des quelque cinq dernières années, de nombreux auteurs ont tenté de définir des approches méthodologiques visant à utiliser quantitativement la réaction de polymérisation en chaîne. Tel que cité dans l'introduction de ce mémoire, le but premier de cet exercice n'était pas, en soi, un contrôle de qualité de la réaction; mais, *de facto*, ces efforts ont eu des retombées directes à ce niveau. En étudiant de plus près la cinétique de la réaction, en relevant les implications mathématiques du facteur "efficacité", et en s'aidant de standards de comparaison; ces chercheurs ont défini les bases théoriques et expérimenté les outils éventuellement nécessaires au contrôle de qualité de la PCR.

7.1 Différentes approches

Plusieurs auteurs ont utilisé la relation linéaire observée, à l'intérieur de la phase exponentielle d'amplification, entre la quantité initiale d'ADN à amplifier et la quantité finale d'amplicons obtenus (Arrigo *et al.*, 1989; Chelly *et al.*, 1989; Rappolee *et al.*, 1989; Schnittman *et al.*, 1989; Singer-Sam *et al.*, 1990; Bagnarelli *et al.*, 1991). Cependant, cette "fenêtre" dépend entièrement de l'abondance du matériel de départ: plus le matériel est abondant, plus la fenêtre est étroite (Chelly *et al.*, 1990; Kellog *et al.*, 1990). Elle est aussi grandement influencée par les différences dans la préparation de l'échantillon, la performance du thermocycleur, les conditions de la réaction et la présence d'inhibiteurs; d'où des fluctuations inévitables de tube à tube. Des contingences similaires s'appliquent aux méthodes utilisant l'analyse par dilution limite de l'échantillon (Simmonds *et al.*, 1990; Sykes *et al.*, 1992). Dans tous ces cas, quoique des résultats semi-quantitatifs puissent être obtenus à partir de courbes de dilutions, l'analyse réellement quantitative s'est avérée lourde et difficile.

Une approche destinée à surmonter les variations de tube à tube, a été la coamplification, à l'intérieur d'un tube unique, de l'échantillon et d'un acide nucléique endogène servant de référence. Celui-ci étant un gène cellulaire présent en une seule copie (Kellog *et al.*, 1990; Pang *et al.*, 1990; Frye *et al.*, 1989; Neubauer *et al.*, 1990) ou encore, un ARNm exprimé de façon ubiquitaire (Chelly *et al.*, 1989; Noonan *et al.*,

1990). On peut qualifier cette stratégie de PCR "multiplex" puisque deux gabarits différents sont amplifiés simultanément, en utilisant deux paires d'amorces distinctes. Le principe derrière cette démarche est que toute variable influençant l'amplification devrait affecter de façon similaire la référence et l'échantillon; en autant que la réaction soit considérée dans sa phase exponentielle. Cependant, même si tous les paramètres d'amplification, pour chacune des paires d'amorces, sont déterminés empiriquement à l'avance; on a souvent reproché à cette stratégie que la nature des deux séquences amplifiées et des différentes séquences d'amorces utilisées, puisse influencer de façon imprévisible l'efficacité de l'amplification. Par exemple, quand Murphy et collaborateurs (1990) ont ajouté les amorces spécifiques à la β_2 -microglobuline à celles de *mdr-1*, dans la même réaction de PCR, ils ont observé une atténuation précoce de la phase exponentielle des deux amplifications.

Pour toutes ces raisons, d'autres chercheurs ont privilégié une PCR quantitative basée sur la coamplification d'un standard qui partage avec la séquence cible les mêmes sites d'amorçage et, à peu de choses près, la même séquence entre ces sites. De telle sorte que les deux gabarits homologues compétitionnent pour la même paire d'amorces et, subséquemment, présentent la même courbe d'amplification. C'est la PCR compétitive. Les deux populations d'amplicons peuvent être distinguées par une différence de longueur (Seibel *et al.*, 1991; Telenti *et al.*, 1992; Piatak *et al.*, 1993; Goswami *et al.*, 1994), ou encore par la présence d'une mutation créant sur le

compétiteur un nouveau site de restriction (Becker-André et Hahlbrock, 1989; Gilliland *et al.*, 1990; Friedhoff *et al.*, 1993). Une variante sur ce thème consiste à utiliser un standard interne synthétique partageant les mêmes amorces que l'ADN cible, mais dont la séquence générale est partiellement ou totalement hétérologue (Javala *et al.*, 1993; Lehtovaara *et al.*, 1993). Les amplicons sont alors différenciés grâce à des sondes spécifiques.

Puisque des séquences compétitrices naturelles sont rarement disponibles, le problème majeur de la PCR compétitive est la construction de telles séquences. Ceci peut représenter un délicat travail de mutagenèse et de clonage. Cependant, plusieurs stratégies ingénieuses ont été développées afin de générer ces standards internes exogènes, et ce, à partir d'une simple amplification par PCR utilisant des amorces composites (Diviacco *et al.*, 1992; Celi *et al.*, 1993; Vanden Heuval *et al.*, 1993). Ainsi, Sarkar et Bolander (1994) ont créé un standard interne en utilisant, lors d'une première PCR, une longue amorce spécifique à la séquence cible, mais contenant (au 2/3 de sa longueur) une insertion hétérologue de 26 nucléotides. Cette insertion, composée uniquement de A et de T, formait une bulle. Malgré la présence de cette dernière, l'hybridation demeurait possible, et le nouveau gabarit a été généré. Celui-ci, une fois dilué, a servi de compétiteur lors de la deuxième PCR, en utilisant cette fois une version tronquée de l'amorce modifiée et parfaitement complémentaire tant à l'ADN cible qu'au standard interne. Les deux populations d'amplicons se distinguaient par la

différence de longueur et par la présence d'un nouveau site de restriction *RsaI* introduit sur l'amorce modifiée.

7.2 Détection et quantification des produits de PCR

Le but premier de la PCR quantitative est de déduire, à partir de la quantité finale d'amplicons, la quantité initiale de molécules cibles (N_0) ou encore, les niveaux de départ relatifs de molécules cibles parmi plusieurs échantillons. Ceci implique donc la nécessité d'un instrument de mesure des produits de PCR.

L'utilisation de nucléotides marqués radioactivement au ^{32}P représente un moyen très courant de détection et de quantification des amplicons. Plusieurs chercheurs ont employé le marquage direct des produits de PCR, évitant ainsi la détection indirecte par sondes moléculaires isotopiques (Noonan *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1989; Pang *et al.*, 1990; Gilliland *et al.*, 1990). Différentes raisons peuvent motiver ce choix: parce que la PCR quantitative exige une optimisation fine de l'amplification, la spécificité additionnelle due à la sonde peut ne pas être requise; le marquage direct demande moins d'efforts; la procédure a potentiellement un plus grand pouvoir quantitatif, car elle assure une mesure directe du nombre d'amplicons. Le marquage peut se faire via les amorces ou par l'incorporation d'un nucléotide radioactif en cours de PCR.

Les procédures utilisant le marquage radioactif de l'extrémité 5' de l'amorce, par opposition à celles utilisant un [α -³²P]- dXTP, offrent une plus grande sensibilité car le pourcentage d'amplicons générés et marqués est supérieur, de l'ordre d'un log (Ferre, 1992). Certains auteurs ont aussi utilisé la radio-empreinte ("radioimaging") et des systèmes de quantification directe, tel le système AMBIS, au lieu d'exciser les bandes du gel d'électrophorèse et de compter les cpm en vials (Ferre *et al.*, 1992; Aoki *et al.*, 1990; Singer-Sam *et al.*, 1992). La radio-empreinte permet une quantification précise et un large écart dynamique de cinq ordres de grandeur, alors que la réponse linéaire de l'autoradiographie est limitée à moins de trois ordres de grandeur (Ferre, 1992).

Pour des raisons autant pratiques qu'écologiques, plusieurs chercheurs ont tenté de remplacer la détection utilisant la radioactivité par des techniques non isotopiques, mais aussi sensibles. Comme la réponse linéaire est beaucoup plus large lorsqu'on compte des particules plutôt que la transmittance de la lumière ("radioimaging" vs densitométrie), des techniques utilisant la chimiluminescence (dans un format où l'émission de photons est effectivement comptée) semblent prometteuses (Ou *et al.*, 1990; Arnold *et al.*, 1989). Des recherches ont aussi été faites du côté de la fluorescence (Landgraf *et al.*, 1991a; Porcher *et al.*, 1992). Ainsi, Pannetier et collaborateurs (1993) ont utilisé une amorce interne fluorescente hybridée à un des deux brins du produit de PCR, et allongée par l'ADN polymérase *Taq*. Ils ont ensuite procédé à l'électrophorèse des chaînes terminées à l'aide d'un séquenceur automatique qui détectait quantitativement la fluorescence incorporée.

Plusieurs méthodes quantitatives ont été développées sur la base de techniques de détection non isotopiques produisant une couleur (Syvänen *et al.*, 1988; Lunderberg *et al.*, 1991) et pouvant être associées à un format ELISA (Alard *et al.*, 1993; Friedhoff *et al.*, 1993; Gibellini *et al.*, 1993; Lehtovaara *et al.*, 1993). Traditionnellement, les micro-plaques de polystyrène ont été utilisées pour immobiliser différents antigènes ou anticorps, mais des études plus récentes ont montré qu'elles pouvaient aussi servir à immobiliser de l'ADN à l'intérieur des cupules: par adsorption passive (Keller *et al.*, 1990; Tham et Guesdon, 1992; Nikiforov et Rogers, 1995), par irradiation aux UV (Oser et Valet, 1988; Morrissey et Collins, 1989), par couplage covalent de l'ADN modifié (Keller *et al.*, 1989; Running et Urdea, 1990), et directement par couplage covalent entre le groupe amino secondaire modifié du polystyrène et l'ADN non modifié (Rasmussen, 1990; Rasmussen *et al.*, 1991).

Ces supports non poreux de polystyrène ont été employés dans des techniques d'hybridation selon différentes stratégies. Ce fut principalement des hybridations immobilisant directement l'ADN cible de l'échantillon (Nagata *et al.*, 1985), ou des hybridations de type "sandwich" pour immobiliser la sonde rapporteur ("capture probe") (Polsky-Cynkin *et al.*, 1985). Alternativement, ces mêmes supports ont été utilisés pour immobiliser des protéines (e.g., anticorps, avidine) ayant une affinité envers des molécules hybrides (Syvänen *et al.*, 1986; Morrissey et Collins, 1989) ou des produits de PCR marqués (Harju *et al.*, 1990; Landgraf *et al.*, 1991b).

Comparativement aux méthodes isotopiques déjà décrites, la sensibilité des méthodes enzymatiques est moindre et la fenêtre de réponse linéaire plus étroite (environ deux ordres de grandeur: Chevrier *et al.*, 1993). Cependant, en terme de laboratoire de diagnostic, elles présentent des avantages évidents. Premièrement, il est indispensable de vérifier la spécificité de la PCR en utilisant une sonde appropriée. Cette sonde doit être non radioactive et doit permettre l'automatisation du processus. (De nombreuses méthodes non radioactives de marquage et de détection des acides nucléiques ont été décrites au cours des derniers quinze ans: revue par Guesdon, 1992). Deuxièmement, les méthodes enzymatiques n'exigent pas de matériel sophistiqué et onéreux. Troisièmement, en alliant la PCR à l'hybridation moléculaire, le diagnostic bénéficie de la sensibilité de la PCR, de la spécificité de la sonde et de la simplicité de la détection enzymatique.

8. DÉTECTION DES MUTATIONS PAR PCR

L'identification et la caractérisation des mutations ont été historiquement importantes pour chacune des branches de la biologie et de la médecine. Leur étude a contribué significativement à notre compréhension des mécanismes physiologiques normaux tout autant qu'à la pathogénèse des maladies. De plus en plus, l'intérêt se porte aujourd'hui vers le décodage des interactions entre la structure des protéines et leurs fonctions, ainsi qu'à la corrélation entre le génotype et le phénotype des maladies. Cette

dernière démarche est particulièrement intéressante dans le cas du PPV, puisque des variations génomiques mineures entre différents isolats ont un impact majeur quant aux pathogénicités observées.

Un nombre sans cesse croissant de méthodes se sont développées, permettant une analyse rapide de séquences génomiques spécifiques, tout en réduisant les exigences en termes de quantité d'échantillon, de temps, et de complexité manuelle. Plusieurs de ces méthodes utilisent, soit directement, soit indirectement, la réaction de polymérisation en chaîne afin de détecter des mutations ponctuelles ou des polymorphismes impliquant l'altération d'un ou de plusieurs nucléotides. Essentiellement, ces techniques peuvent être divisées en deux groupes: celles utilisées dans la détection de mutations spécifiques, précédemment caractérisées et séquencées (diagnostic); et celles employées afin de détecter la présence de différences de séquence inconnues à l'intérieur d'une région donnée d'ADN (dépistage).

8.1 Détection de séquences mutantes connues

Les méthodes détectant des substitutions ponctuelles connues (e.g., les mutations de c-Ras lors de cancers humains) ou de petites délétions (e.g., la délétion de 3pb dans la fibrose kystique) ne peuvent être développées que lorsque la relation mutation-maladie a été établie. Dans le cas du parvovirus porcine, par exemple, le déterminant

allotropique fort probablement responsable des pathogénicités très différentes entre les souches NADL-2 et Kresse a été clairement identifié (Tijssen *et al.*, 1995; Bergeron *et al.*, 1996). Les tests diagnostics sont donc développés afin de détecter spécifiquement la présence ou l'absence d'une telle séquence mutée. Cet objectif peut être atteint grâce à deux stratégies générales. La première, utilisant l'hybridation spécifique d'un oligonucléotide; et la deuxième s'appuyant sur l'action particulière de certaines enzymes reconnaissant une séquence cible donnée.

La stabilité thermique et le point de fusion d'un duplex d'ADN sont affectés par le type et le nombre d'appariements non spécifiques entre les deux brins (revue par Tijssen, 1993). Plus court est l'hybride, plus grande sera l'instabilité due aux mésappariements ("mismatches"); et conséquemment, la détection sera facilitée en jouant sur les différentes conditions d'hybridation. Des oligonucléotides distincts peuvent être dessinés de façon à n'être complémentaires et spécifiques qu'à la séquence du type mutant ou à celle du type sauvage. L'hybridation d'oligos spécifiques à la séquence peut se faire d'une des deux façons suivantes. En solution, comme amorces durant l'amplification par PCR; ou comme sondes marquées devant s'hybrider au produit de PCR immobilisé sur un support solide. La reconnaissance enzymatique, quant à elle, peut prendre l'une des deux formes suivantes. La reconnaissance d'une courte séquence spécifique (souvent palindromique) par une endonucléase de restriction ou une méthylase; ou encore, en utilisant la fidélité de ligases ou d'ADN polymérases

liant ou allongeant une amorce, lorsque la séquence cible le permet.

Dans sa forme la plus simple, la PCR est utilisée directement pour montrer l'absence ou la présence de séquences normales ou mutées. Une des premières applications de la PCR utilisant une polymérase thermostable a été le diagnostic prénatal de l' α -thalassémie, due à une délétion de 23 kb (Chehab *et al.*, 1987). Dans le même esprit, la PCR multiplex a été employée pour la détection de mutations sur le gène de la dystrophine, dans la maladie de Duchenne (Chamberlain *et al.*, 1988). De petites délétions ou insertions ont pu être détectées par la longueur du produit de PCR, comme dans le cas de la fibrose kystique (Rommens *et al.*, 1990). Si la PCR est optimisée de telle sorte que seulement des séquences parfaitement complémentaires soient amplifiées, différents allèles peuvent être préférentiellement amplifiés, selon l'amorce utilisée. Des méthodes de ce type ont été nommées ASPCR (*allele-specific PCR*: Wu *et al.*, 1989), ASA (*allele-specific amplification*: Okayama *et al.*, 1989), PASA (*PCR amplification of specific alleles*: Sommer *et al.*, 1989), ARMS (*amplification refractory mutation system*: Newton *et al.*, 1989), et MAMA (*mismatch amplification mutation assay*: Cha *et al.*, 1992). Alternativement, l'hybridation de l'ADN cible à des oligos-sondes spécifiques à l'allèle sied particulièrement bien aux produits de PCR; et plusieurs méthodes utilisant ces ASO (*allele-specific oligonucleotide*) ont été utilisées pour détecter de petites mutations de l'ADN génomique (Wallace *et al.*, 1981).

Les enzymes de restriction ont servi à la reconnaissance de mutations ponctuelles liées à l'existence de plusieurs maladies congénitales (Chehab et al., 1987). La digestion de produits de PCR contenant ces sites de restriction résulte en un polymorphisme des fragments de restriction de différentes longueurs entre les individus sains et malades: c'est le RFLP (*restriction fragment length polymorphism*: Iland et Todd, 1992). Finalement, d'autres familles d'enzymes, telles les méthylases qui reconnaissent une séquence spécifique de façon analogue aux endonucléases, ou les ligases qui peuvent être utilisées pour joindre deux amorces contiguës si l'ADN cible est parfaitement complémentaire, ont aussi été employées pour identifier des mutations connues (Landergren *et al.*, 1988; Kalin *et al.*, 1992; Petty *et al.*, 1992).

8.2 Détection de mutations inconnues

Le dépistage d'une mutation dans un produit de PCR, n'importe où le long de sa séquence, requiert une approche différente de celles utilisées en diagnostic. En fait, la séquence véritable et la localisation exacte de la mutation ne peuvent généralement être obtenues. C'est pourquoi le dépistage est habituellement suivi de séquençage pour obtenir l'information complète. De plus, la majorité de ces méthodes de dépistage peuvent rarement détecter toutes les mutations possibles. La tolérance de tels faux négatifs est souvent permise en recherche, là où ces techniques sont principalement appliquées.

On peut détecter les différences de séquence de l'ADN en se basant sur les propriétés physico-chimiques variées de l'acide nucléique mono ou bicaténaire. Les mutations introduites sur l'ADN simple brin modifient la composition des bases et peuvent influencer la structure secondaire de la séquence. Chez l'ADN bicaténaire, la dénaturation et le ré-appariement d'un mélange à peu près équimolaire d'ADN mutant et sauvage résultent en la formation de deux éventuels hétéroduplex (mésappariements dus à la mutation), en plus des deux homoduplex parfaitement appariés. Les hétéroduplex sont décelés par des changements de mobilité électrophorétique ou de stabilité thermique, ou encore par des modifications au site de non appariement.

La façon la plus directe pour détecter les faux appariements produits par les hétéroduplex est de procéder à l'électrophorèse sur gels non dénaturants. Les hétéroduplex migrent plus lentement sur gels que leurs homoduplex respectifs. Ce retard de mobilité électrophorétique est présumément dû à une déviation de la conformation hélicoïdale de la double hélice plutôt qu'à un changement stérique local (Sorrentino *et al.*, 1991). Un gel non dénaturant de polyacrylamide peut résoudre des insertions ou délétions de l'ordre de trois à quatre bases (Nagamine *et al.*, 1989). Alternativement, des gels dénaturants peuvent être employés lors de la DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*: Myers *et al.*, 1985). Dans ce cas, c'est la baisse de stabilité thermique de l'hétéroduplex contenant des "mismatches" qui est mise à profit. On procède à l'électrophorèse de l'ADN double brin sur gel de polyacrylamide

contenant un gradient progressif de dénaturant (urée ou formamide), le tout, à température constante. Les brins sont progressivement dénaturés par domaines de stabilité similaire; comme le duplex devient partiellement simple-brin, sa mobilité est retardée. Plusieurs variantes sur ce thème ont été développées en introduisant des variations de température (Po *et al.*, 1987; Yoshino *et al.*, 1991). Finalement, les mésappariements peuvent être modifiés par clivage enzymatique à la ribonucléase A (Myers *et al.*, 1985), par clivage chimique (Gogos *et al.*, 1990), ou par marquage au carbodiimide (Ganguly et Prockop, 1990). L'avantage de ces dernières méthodes tient au fait que le site de non appariement peut généralement être localisé.

Les propriétés de l'ADN monocaténaire permettent aussi la détection des mutations. Le SSCP (*single-stranded conformation polymorphism*) est obtenu en dénaturant l'ADN bicaténaire et en fractionnant les mono brins sur un gel de polyacrylamide non dénaturant (Orita *et al.*, 1989). Dans des conditions appropriées, la mobilité électrophorétique de l'ADN monocaténaire est dépendante, non seulement de sa longueur et de son poids moléculaire, mais aussi de sa structure secondaire; et celle-ci est affectée par la présence des mutations. Cette méthode a été adaptée pour une utilisation avec de l'ADN génomique comme avec de l'ADN amplifié; et une variété de modifications et de formats ont été décrits (Iizuka *et al.*, 1992).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MATÉRIEL DE DÉPART

1.1 *Souche virale de PPV*

La souche de référence PPV NADL-2, obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC #VR-742), a servi de contrôle lors de l'extraction d'ADN des échantillons cliniques et lors des tentatives de transfection. Elle a aussi été utilisée au cours du développement des méthodes de PCR différentielle et quantitative. La production de stock viral sur cellules de trompes de Fallope porcines (PFT) en culture dans du milieu D-MEM additionné de 10% de sérum foetal bovin, était normalement assurée par le Service de diagnostic vétérinaire (Mme M. Benoit). Le titre hémagglutinant (globules rouges de cobaye à 0,45% dans du PBS³), de même que la dose infectieuse sur culture de tissus (DICT₅₀) étaient déterminés selon les méthodes en usage dans le Service et décrites dans le Manuel de techniques virologiques (Payment et Trudel, 1989).

1.2 *Constructions de laboratoire*

Les formes répliquatives (RF) de l'ADN viral des souches NADL-2 et Kresse ont été extraites et clonées par Bergeron et collaborateurs (1993 et 1996) et, pour chacune

³ PBS: 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, pH 7,4 (Gibco).

des deux souches, un clone contenant le génome entier et infectieux du parvovirus a été utilisé. Le clone P17 correspondait à la souche non pathogène NADL-2 insérée dans le vecteur pUC 19, au niveau du site *Sma*I; alors que le clone K5R12 correspondait à la souche pathogène Kresse insérée dans le vecteur pUC 18, au niveau du même site de restriction. Les deux plasmides ont permis la transformation de cellules compétentes *E.coli* XL1-BLUE (Stratagene). Ces constructions de laboratoire ont servi de matériel de base pour toutes les expériences de développement et de mise au point des PCR différentielle et quantitative. De plus, le clone P17 a été utilisé pour l'étude de stabilité de l'ADN, de même que comme matrice lors de la mutagenèse dirigée.

1.2.1 Culture

Lorsqu'un stock d'ADN plasmidique était nécessaire, 50 μ L du clone requis (cellules XL1-BLUE transformées et conservées à -70°C dans 50% de glycérol stérile) étaient mis en culture dans 2 mL de milieu 2YT⁴ additionné d'ampicilline sodique (75 μ g/mL, [C] finale). Les plasmides pUC, portant le gène de résistance à l'antibiotique, assuraient la croissance des bactéries transformées. Les éprouvettes étaient ensuite agitées à 250 rpm, à 37°C, pour la nuit. Pour obtenir des quantités plus importantes, cette première culture servait à ensemercer un volume de 2YT cent fois supérieur et le

⁴ 2YT: 16 g/L de bacto-tryptone et 10 g/L d'extrait de levure (Difco), 5 g/L de NaCl. Après avoir ajusté le pH à 7,0; le tout était autoclavé 20 min. Pour les géloses, 15g/L de bacto-agar (Difco) étaient inclus au mélange avant stérilisation.

tout était remis en agitation, aux mêmes conditions.

1.2.2 Purification

Règle générale, l'ADN plasmidique était extrait et purifié selon la technique classique de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989). Cependant, à certaines occasions (e.g. lors de l'étude de stabilité de l'ADN), les trousse de Qiagen (Plasmid Mini Kit) et de Promega (Magic MiniPreps) ont été utilisées.

Dans le premier cas, le culot provenant de la centrifugation de 1,5 mL de bouillon de culture était resuspendu vigoureusement dans 100 µL de solution I froide (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 et 10 mM EDTA pH 8,0). Ensuite, 200 µL de solution II (0,2 N NaOH, 1% SDS) étaient ajoutés et le tube était agité doucement par inversions répétées. Puis, le tube reposant dans de la glace fondante, 150 µL de solution III froide (3 M potassium et 5 M acétate, pH 4,8) étaient ajoutés. Le tout était alors agité par inversion avant d'être centrifugé 5 min à 12 000 x g. Le surnageant était ensuite récupéré, et un volume égal de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) était ajouté. Après une centrifugation de 2 min, le surnageant était récupéré de nouveau, mélangé à 2 volumes d'éthanol, puis centrifugé 10 min afin de précipiter l'ADN plasmidique. Finalement, le culot était lavé avec 1 mL d'éthanol à 70%, puis séché sous vide avant d'être resuspendu dans 50 µL de tampon TE (10mM Tris-HCl pH 8,0 et 1 mM EDTA, pH 8,0) contenant de la RNase A (20 µg/mL).

Les trousseaux Qiagen et Promega étaient utilisés selon les recommandations des fabricants. Dans les deux cas, le culot bactérien était resuspendu dans un tampon Tris-EDTA, contenant 100 µg/mL de RNase A, avant de subir une lyse alcaline équivalente à la méthode précédente. Cependant, contrairement à cette dernière, l'ADN plasmidique était isolé grâce à des résines échangeuses d'ions, à base de gel de silice. L'acide nucléique était finalement élué dans 50 µL de tampon TE à pH 8,0.

1.2.3 Quantification

La quantification des acides nucléiques purifiés se faisait généralement par la mesure au spectrophotomètre de l'absorbance à 260 nm d'une dilution donnée. Le rapport des absorbances obtenues à 260 et 280 nm permettait d'évaluer la présence résiduelle de protéines. Lorsque l'échantillon d'ADN plasmidique était contaminé par des traces d'ARN, comme c'était le cas avec la procédure classique d'extraction par lyse alcaline, la quantification se faisait à l'aide d'une lecture au spectrofluoromètre (Hoefer). Le colorant de Hoescht, utilisé dans cette procédure, ayant très peu d'affinité pour l'ARN, la présence de ce dernier ne faussait pas la lecture obtenue.

De plus, et de façon régulière, l'évaluation de la quantité et de la qualité de la préparation d'ADN plasmidique était confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose. Habituellement, l'équivalent de 100 à 200 ng d'ADN était déposé dans un puits du gel

horizontal à l'aide d'un tampon d'alourdissement contenant un colorant (solution 10X: 50% glycérol, 1% SDS, 0,25% bleu de bromophénol et 0,1 M EDTA disodique à pH 8,0). Le gel contenait 0,8% d'agarose (cette concentration pouvait varier selon la grosseur des molécules à séparer: le pouvoir de résolution augmentant parallèlement à la [C]) dans du tampon d'électrophorèse 1X TAE⁵ ou TBE⁶. Un marqueur de poids moléculaire, choisi selon les caractéristiques de l'ADN à évaluer, accompagnait la migration (habituellement, marqueurs III ou VI de Boehringer Mannheim). Une fois l'électrophorèse complétée (environ 1 h à 100 V), le gel était coloré par immersion dans un bain de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL H₂O) durant une vingtaine de minutes, pour être ensuite photographié sous lumière UV à l'aide d'un transilluminateur.

1.3 Échantillons cliniques

Plus d'une centaine d'échantillons cliniques, recueillis et testés par le Service de diagnostic virologique vétérinaire (Mme R. Jetté), ont été utilisés dans ce projet. La presque totalité des cas soumis provenait de foetus porcins (poumon, rein, rate) auxquels se sont ajoutés quelques spécimens de peau (dermatite), de placenta ou d'intestins porcins. La présence de PPV a été scrutée selon les procédures en usage

⁵ TAE 50X: 242 g Tris base, 57,1 mL acide acétique glacial, 37,2 g Na₂EDTA-2H₂O.
Volume complété à 1 L avec H₂O.

⁶ TBE 10X: 108 g Tris base, 55 g acide borique, 40 mL 0,5 M EDTA à pH 8,0 / L H₂O.

dans le Service: immunofluorescence directe sur coupes de tissus (sérum polyclonal anti-PPV conjugué à la fluorescéine, de fabrication maison), passages de surnageants de broyats tissulaires sur cellules de testicules de porc (PT), détection virale par hémagglutination (HA), effet cytopathique (ECP) et microscopie électronique (dans certains cas).

2. PCR DIFFÉRENTIELLE

Afin de distinguer les souches pathogènes et non pathogènes de PPV, une méthode modifiée de PCR "classique" a été développée en se basant sur l'élongation spécifique d'une amorce donnée grâce à sa complémentarité ou non à l'ADN cible. La stratégie impliquait l'utilisation de quatre amorces différentes à l'intérieur du même cocktail d'amplification. Les deux amorces extérieures et de directions opposées couvraient une région de la VP2 du PPV englobant quatre des cinq mutations distinguant les souches, de même que la répétition de 127 nt située tout près de l'extrémité 5' du génome. Ces deux oligonucléotides étaient parfaitement complémentaires tant au génome pathogène que non pathogène du virus. Cependant, la présence ou non de la répétition pouvait générer deux amplicons de longueurs différentes. Les deux amorces intérieures, elles aussi de directions opposées, couvraient respectivement une des deux régions correspondant aux mutations ponctuelles retrouvées aux positions 3942 (A/G) et 3958 (C/A). Ces amorces étaient dessinées de

telle sorte que leurs extrémités 3' (point de départ de l'élongation par la polymérase) étaient respectivement complémentaires, soit au génome virulent, soit au génome avirulent. Dans des conditions appropriées, peu importe le type de PPV présent, seulement trois des quatre amorces utilisées permettaient une élongation, du fait de leur complémentarité au gabarit. Dans chaque cas, deux amplicons étaient générés: le premier provenant des amorces extérieures, et le deuxième résultant de l'oligonucléotide spécifique à la cible rencontrée combiné à l'amorce extérieure de direction opposée. Chacun des amplicons potentiels étant de longueur suffisamment différente, il devenait possible de les distinguer après électrophorèse sur gel d'agarose et de déduire le type de PPV présent au départ.

2.1 Amorces utilisées

Plusieurs amorces ont été utilisées lors de la mise au point de la PCR différentielle (Tableau 4). Une première série concernait les amorces extérieures devant amplifier indistinctement les génomes pathogènes et non pathogènes des différentes souches de PPV. Les amplicons générés établissaient la positivité de l'échantillon au virus. Les amorces pr32 et pr10 étaient de direction "sens", alors que pr6 et pr30 étaient "anti-sens". Cette dernière (pr30) se situait avant la répétition de 127 nt et a servi à évaluer l'impact de la répétition sur l'efficacité de l'amplification, plutôt qu'à la PCR différentielle comme telle.

Une deuxième série d'amorces, internes à la première série, visait à distinguer les souches de PPV et s'adressait spécifiquement à deux mutations ponctuelles, séparées par 15 nt, et révélatrices du type de génome présent (Bergeron *et al.*, 1993 et 1996). Une première stratégie utilisa différentes versions de pr28 et pr29: cette dernière était en direction "sens", tout en étant complémentaire au génome avirulent quant à la mutation sise à 3942; pr28 était "antisens" et complémentaire au génome virulent en regard de la mutation sise à 3958. Le dernier nucléotide, à l'extrémité 3' de ces amorces, déterminait la complémentarité au génome choisi. L'ajout de mésappariements ("mismatches") supplémentaires, en avant-dernière position 3', visait à déstabiliser davantage les hybrides et à discriminer plus efficacement l'ADN cible. Selon la même logique, une seconde stratégie utilisa pr34 et différentes versions de pr35. Cette fois, l'amorce "sens" pr34 était complémentaire au génome virulent quant à la mutation présente à 3942, et l'amorce "antisens" pr35 était complémentaire au génome avirulent en regard de la mutation sise à 3958. De nouveau, des mésappariements supplémentaires ont été introduits à l'extrémité 3' afin de fragiliser l'hybridation des oligonucléotides et de ne permettre l'élongation que de l'amorce conforme au génome correspondant. Les différentes stratégies employées exploitaient l'impact variable de la présence de ces nucléotides non appariés entre l'amorce et la cible, en cours de PCR (revue par Tijssen, 1993).

Tableau 4

Amorces PPV utilisées lors de la mise au point de la PCR différentielle.

Amorce PPV- ...	Position ¹	Séquence 5' → 3' ²	Cible ³	Commentaires
pr32	3584-3603	GGAGATGAATTCTCCACAGG	A , V	
pr10	3626-3650	CCACTAAAATTA ACTCACTCATG GC	A , V	
pr30	4446-4426	TGTTGTTGAATAGGGTTCCAC	A , V	avant la répétition
pr6	4858-4833	GTTAATAGTAAACACATGAGAG CTTG	A , V	après la répétition
pr28 M1	3979-3958	CTCTTGTGAAGATGTGGTAAAT	V	
pr28 M2	3979-3958	GTCTTGTGAAGATGTGGTACT	V	1 mésappariement
pr29 M1	3921-3942	GTGCTATAAGATTTACAATGGA	A	
pr29 M2	3921-3942	GTGCTATAAGATTTACAATGAA	A	1 mésappariement
pr29 M3	3921-3942	GTGCTATAAGATTTACAATGTA	A	1 mésappariement
pr34	3921-3942	GTGCTATAAGATTTACAATGCG	V	1 mésappariement
pr35 (1)	3979-3958	CTCTTGTGAAGATGTGGTTATG	A	1 mésappariement
pr35 (2)	3978-3957	_TCTTGTGAAGATGTGGTTATGC	A	2 mésappariements
pr35 (3)	3978-3957	_TCTTGTGAAGATGTGGTTATGG	A	2 mésappariements

¹ Une position en nombres ascendants indique une séquence identique au brin + du PPV (amorce sens); alors qu'une position en nombres descendants indique une séquence inverse et complémentaire du brin + du PPV (amorce anti-sens).

² Un nucléotide gras et souligné est non apparié aux deux types d'ADN cible.

³ A: amorce conforme au génome avirulent du PPV (Bergeron *et al.*, 1993);
V: amorce conforme au génome virulent du PPV (Bergeron *et al.*, 1996).

2.2 Conditions d'opération

Conjointement aux amorces, plusieurs réactifs et paramètres ont été testés lors du développement de la PCR différentielle. Premièrement, différentes températures d'hybridation tenant compte de la précarité volontaire des amorces internes, de même que les concentrations relatives de celles-ci ont été essayées vis-à-vis les deux matrices de base (clones P17 et K5R12). Ces dernières ont été employées à plusieurs concentrations de départ afin d'évaluer l'efficacité de l'amplification. Afin d'optimiser celle-ci, le tampon PCR de base (Bio/Can Scientific) a été comparé à un panel en échiquier de 20 tampons "maison" reprenant la composition du précédent, mais faisant varier le pH (8,5; 9,0; 9,5; 10,0) et la concentration finale en $MgCl_2$ (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 et 3,5 mM). Le tampon choisi et la polymérase *Taq* de Bio/Can ont été testés en parallèle aux enzymes *Taq* de Pharmacia et *AmpliTaq* de Cetus, dans leurs tampons respectifs. Différentes concentrations d'enzyme ont été évaluées, particulièrement en ce qui a trait aux échantillons cliniques, où des inhibiteurs pouvaient interférer. De plus, l'addition (seule ou combinée) de quelques cosolvants tels le DMSO à 5%, la formamide à 5%, le Tween-20 à 1% et le glycérol à 10% a été testée. Enfin, l'utilisation de tubes pour PCR "Thin Walls" de Cetus (#N801-0537) a été comparée à celle de tubes conventionnels de Fisher (#05-664-4).

2.3 "Modus operandi"

Partant du modèle de base d'une réaction de PCR classique où tous les éléments étaient combinés à température ambiante, puis recouverts d'une couche d'huile minérale avant d'être positionnés dans le thermocycleur, différentes modifications à ce mode opératoire ont été pratiquées afin de déterminer quelle démarche favorisait une efficacité maximale. Le préchauffage de l'ADN avant "aliquotage", la dénaturation de la matrice à température élevée et l'influence du départ à chaud ("hot start") ont été examinés. Dans ce dernier cas, le cocktail d'amplification était divisé en deux parties contenant chacune des éléments déterminés (e.g. dNTP, amorces, matrice d'ADN, *Taq* polymérase, etc.) et isolées l'une de l'autre par une couche de paraffine (Hébert *et al.*, 1993). Une fois tous les éléments en place, les tubes étaient positionnés dans le thermocycleur à une température excédant celle de l'hybridation des amorces et tous les réactifs n'étaient véritablement rassemblés qu'une fois la cire fondue.

Règle générale, plusieurs dilutions de matrice NADL-2 (P17 ou PPV, allant de 5×10^8 à 5×10^3 molécules) étaient utilisées conjointement aux amorces extérieures pr6 et pr10 afin de générer un amplicon de 1232 pb. Le tout était soumis à 35 cycles d'amplification, aux conditions alors jugées les meilleures, puis analysé sur gel d'agarose.

2.4 Visualisation des produits de PCR

Habituellement, 10 μ L de produits de PCR additionnés de tampon d'alourdissement 10X (section 1.2.3) étaient déposés dans un puits du gel horizontal d'agarose (1% dans du tampon TBE). Le marqueur de poids moléculaire VI de Boehringer Mannheim accompagnait la migration produite par électrophorèse dans ce même tampon (environ 1 h à 100 V). Enfin, le gel était coloré et photographié tel que décrit précédemment (section 1.2.3).

3. ÉTUDE DE STABILITÉ DE L'ADN

Afin de vérifier le rôle possible d'une dégradation de l'acide nucléique lors des tests de PCR, une étude de stabilité tenant compte de la méthode utilisée pour purifier l'ADN, ainsi que des conditions d'entreposage et de l'effet de dilution, a été dessinée.

3.1 Préparation des matrices

Le clone P17 (PPV-NADL-2) a été utilisé pour cette étude. La culture des bactéries et la purification subséquente de l'ADN plasmidique, par lyse alcaline classique (Sambrook *et al.*, 1989) et avec les troussees Qiagen et Promega, ont été effectuées tel que décrit précédemment (sections 1.2.1 et 1.2.2). Les trois stocks d'ADN ont été quantifiés (section 1.2.3) et ajustés à 100 ng/ μ L.

3.2 Dilutions et entreposage

Les trois solutions-mères (Sambrook, Qiagen, Promega) ont été diluées séquentiellement (la 2^e dilution à partir de la 1^{ère}, la 3^e à partir de la 2^e, etc.) dans de l'eau distillée de façon à obtenir les concentrations suivantes:

Dilution	Facteur	Molécules par 5 μ L	xg/5 μ L
1	"stock"	$5,0 \times 10^8$	4 ng
2	1 log 10	$5,0 \times 10^7$	400 pg
3	1 log 10	$5,0 \times 10^6$	40 pg
4	1/2 log 10	$1,6 \times 10^6$	12,7 pg
5	1/2 log 10	$5,0 \times 10^5$	4 pg
6	1/2 log 10	$1,6 \times 10^5$	1,27 pg
7	1/2 log 10	$5,0 \times 10^4$	400 fg
8	1/2 log 10	$1,6 \times 10^4$	127 fg
9	1/2 log 10	$5,0 \times 10^3$	40 fg

Chacune des dilutions de chaque préparation a été répartie de la façon suivante: 300 μ L conservés à 4°C, 300 μ L conservés à -20°C en vue du gel/dégel, et 3 x 50 μ L conservés à -20°C en prévision d'un usage unique.

À certaines occasions, dans le but de visualiser le transport d'éventuels inhibiteurs de la réaction de PCR, une partie aliquote d'une dilution donnée était mélangée à part égale avec la dilution précédente ou suivante et soumise à la PCR.

3.3 Précipitation et resuspension de l'ADN

À d'autres occasions, afin de vérifier une agrégation possible de l'ADN nuisant à la PCR, une partie aliquote d'une dilution donnée était précipitée, puis resuspendue dans le volume initial avant d'être soumise à la PCR. Pour ce faire, 50 μL de la dilution visée étaient additionnés de 4 μL de polyacrylamide linéaire à 0,25% ($\approx 10\mu\text{g}$), comme porteur (Gaillard et Strauss, 1990). À ce mélange, 6 μL d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 étaient ajoutés (soit 1/10 du volume total), suivis de 150 μL d'EtOH (2,5 volumes). Le tout était précipité à -70°C pendant plus d'une heure, puis centrifugé à 12 000 x g, 1/2 h. Le culot obtenu était ensuite lavé à l'EtOH 70%, puis séché sous vide avant d'être resuspendu dans 50 μL d'eau.

3.4 Conditions de PCR

Pour l'étude de stabilité de l'ADN, les conditions de PCR jugées les meilleures lors de la mise au point de la PCR différentielle ont été employées de nouveau. On trouvera au chapitre des Résultats une description détaillée de la méthode finalement adoptée. Succinctement, 5 μL des différentes dilutions d'ADN étaient utilisés conjointement aux amorces extérieures pr6 et pr10 afin de générer un amplicon de 1232 pb. Une procédure de "hot start" employant une barrière de paraffine partageait la matrice et les dNTP dans le cocktail inférieur, alors que les amorces et la polymérase

Taq (2 U / réaction de 50 μ L) se retrouvaient dans le cocktail supérieur. L'ensemble des réactifs entraient en contact une fois la cire fondue, suite au positionnement des tubes dans le thermocycleur chaud ($>80^{\circ}\text{C}$). Le tout était soumis à 35 cycles d'amplification, puis analysé sur gel d'agarose tel que décrit précédemment (section 2.4).

4. PCR QUANTITATIVE

Suite aux résultats observés lors de la mise au point de la PCR différentielle et de l'étude de stabilité de l'ADN, il devenait évident que l'utilisation de la PCR à des fins diagnostiques exigeait un contrôle de qualité serré. L'occurrence de résultats faux positifs nécessitait l'ajout de contrôles négatifs (réactions-témoins contenant tous les éléments sauf l'ADN cible) et l'exercice de pratiques de laboratoire rigoureuses limitant les contaminations potentielles. Par contre, les variations d'efficacité inhérentes à la PCR et les éventuels faux négatifs obligeaient la mise au point d'un contrôle de qualité plus sophistiqué. Un modèle de PCR quantitative a donc été dessiné.

En ajoutant à la réaction de départ de la PCR une quantité connue de standard interne, il devenait possible par la suite d'évaluer la qualité globale de l'amplification. Afin d'être le plus représentatif possible, cet ADN contrôle devait se confondre, en terme d'efficacité, avec l'ADN à amplifier. À cette fin, nous avons opté pour un standard interne ne différant de la cible que par un site de restriction modifié. Les deux

gabarits compétitionnaient donc pour les mêmes amorces à l'intérieur d'une réaction unique de PCR. Une fois celle-ci complétée, les deux types d'amplicons générés étaient discriminés et quantifiés (via une courbe standard) grâce à un système de détection de format ELISA exploitant la différence de sites de restriction entre les deux populations d'acide nucléique.

4.1 *Le standard interne*

4.1.1 *Mutagenèse dirigée*

Afin d'obtenir un standard interne utilisable lors de la PCR compétitive, une première tentative de mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide de la trousse Doubletake™ Double-Stranded Mutagenesis Kit (Stratagene #200510). Le but visé était de créer une séquence d'ADN en tout point identique à celle de PPV-NADL-2, mais dont le site de restriction *EcoRI*, naturellement présent à la position 3590, serait transformé en site de restriction *BamHI* (G↓AATTC → G↓GATCC). Le clone P17 a servi de matrice pour tous les essais de mutagenèse. La trousse Doubletake™ utilisait la "Terminal deoxynucleotidyl Transferase" (TdT) pour biotinyler les molécules d'ADN bicaténaire linéarisées par coupure plasmidique du clone P17, au site *XmnI* du gène de résistance à l'ampicilline. Cet ADN était ensuite capturé sur des billes enrobées d'avidine et dénaturé en présence de NaOH. Deux oligonucléotides étaient ensuite

hybridés au brin monocaténaire désigné comme gabarit pour le néo-brin muté. Le premier servait d'amorce à l'élongation et était complémentaire à la région *XmnI* du plasmide; alors que le second était complémentaire à la région *EcoRI* du virus et était dessiné de façon à introduire les mutations créant le site *BamHI*. Le néo-brin synthétisé *in vitro* était ensuite décroché des billes et recircularisé à l'aide d'ADN ligase T4 et d'un oligonucléotide de pontage recouvrant le site *XmnI*. Une ADN polymérase T7, combinée à une solution de nucléotides, permettait l'élongation du second brin, complémentaire au néo-brin muté. Les molécules circulaires résultantes servaient à transformer des cellules XL-1 BLUE compétentes.

Ce premier essai de mutagenèse ayant totalement échoué, nous avons tenté de cerner les éléments fautifs. Il s'est avéré que la polymérase T7 était la principale responsable de l'échec. Par séquençage automatique d'une matrice M13 (effectué par Mme J. Roger, Service de séquençage de l'IAF) au moyen du "Automated Laser Fluorescent (A.L.F.) DNA Sequencer" de Pharmacia, et en utilisant la trousse "AutoRead sequencing kit" (Pharmacia) avec la Sequenase version 2.0 *versus* la polymérase T7, il fut clairement démontré que cette dernière avait perdu à peu près toute sa "processivité". Par contre, la ligase T4 a parfaitement réussi à religuer un marqueur de poids moléculaire en un produit unique. Nous avons donc dessiné une nouvelle stratégie de mutagenèse, récupérant les éléments utiles de la trousse Stratagene, mais fortement inspirée de la démarche Clontech (Deng et Nickoloff, 1992)

à la base de la trousse Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit. La Figure 4 résume la stratégie employée.

Premièrement, trois amorces ont été synthétisées (M. François Shareck, Service de synthèse des oligonucléotides de l'IAF):

$\Delta XmnI$: 5' PO₄- GAGAGTTTTTCGCCCGAAGAGGCGTTTTCCAATGATGAGCAC,

PPV-pr4 : 5' PO₄ - GGAATCAGAAATCGACAGCCT (PPV position 519-539) et

PPV-Bam : 5' PO₄ - AGAACAGGAGATGGATCCTCCACAGGAATA (3578-3607).

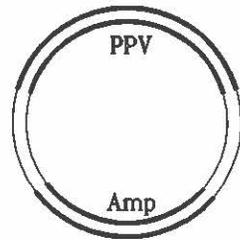
La première couvrait la région du site de restriction *XmnI*, présent sur le gène de résistance à l'ampicilline de pUC 19 (séquence du brin +), mais mutée de telle sorte que le site soit aboli sans que le cadre de lecture soit changé (GAG = GAA → glutamine). Le gène demeurait donc fonctionnel. La deuxième correspondait à la séquence exacte du brin + du PPV et devait servir de support à l'élongation, juste avant le palindrome viral en 3'. PPV-Bam représentait la séquence du brin + du PPV, mais mutée de sorte que le site *EcoRI* soit transformé en site *BamHI*.

Deuxièmement, à 500 ng (100 fmol) d'ADN de clone P17 purifié par Magic MiniPrep (Promega), 4 µL de tampon d'appariement 10X (100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH7,5) et 10 pmol de chacun des trois oligonucléotides ont été ajoutés; le volume étant complété à 40 µL avec de l'eau distillée. Le tout a été dénaturé 3 min à 100°C, puis placé dans un bain de glace durant 5 min afin de permettre

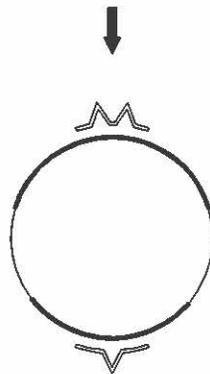
Figure 4

Représentation schématique de la stratégie de mutagenèse dirigée. L'amorce mutagène (PPV-*Bam*) correspond au double pic, alors que l'amorce de sélection ($\Delta XmnI$) correspond au pic unique. Par souci de clarté, l'amorce PPV-pr4, conforme au génome viral et servant de support à l'élongation, a été volontairement omise du dessin.

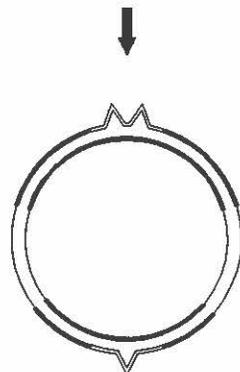
pUC19
+
PPV complet



Dénaturation du plasmide
Hybridation de
l'amorce mutagène
et de l'amorce de sélection

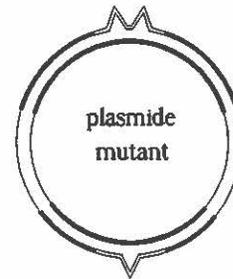


Extension et ligation
(dNTPs + ligase T4 +
polymérase T7)



Digestion avec *Xmn*I

Transformation #1
(BMH 71-18 mutS)

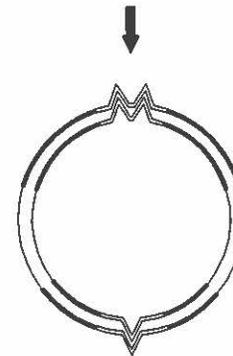


+

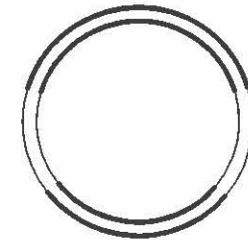


plasmide parental
linéaire

Extraction de l'ADN
plasmidique d'un pool
de transformants

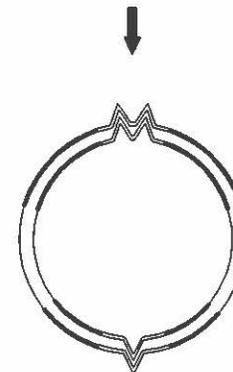


+



Digestion #2 avec *Xmn*I

Transformation #2
(XL1-Blue)



+



l'hybridation des amorces. Après une courte centrifugation, la synthèse du néo-brin s'est faite par addition de 3 μL de ligase Stratagene (4U/ μL), 1 μL de Sequenase 2.0 ($\approx 13\text{U}$), 6 μL H_2O et 50 μL de tampon d'élongation 2X de Stratagene. Le tout a été incubé 2 h à 37°C. Les enzymes ont été inactivées et éliminées par une triple extraction (phénol, phénol:chloroforme, chloroforme) suivie d'une précipitation à l'EtOH en présence de polyacrylamide linéaire comme porteur. Le culot obtenu a été lavé à l'EtOH 70%, séché sous vide et resuspendu dans 44 μL d'eau.

Une première digestion *XmnI* a été faite par ajout de 1 μL d'enzyme de restriction (Boehringer Mannheim, 10U/ μL) et de 5 μL de tampon B 10X (B. Mannheim) aux 44 μL précédents. Après une incubation de 1 h à 37°C, l'enzyme a été inactivée 10 min à 70°C. Cette digestion visait à linéariser le plasmide parental sans affecter le plasmide mutant, théoriquement dépourvu du site de restriction. Ensuite, cet ADN a été utilisé pour transformer des cellules *E. coli* *BMH71-18 mutS* de Clontech. Ces dernières présentaient l'avantage de ne pouvoir correctement corriger des "mismatches" et favorisaient ainsi les plasmides mutants. Les cellules ont été rendues compétentes par traitement au CaCl_2 , tel que décrit par Sambrook et collaborateurs (1989). La transformation elle-même a été obtenue par choc thermique de 200 μL de cellules compétentes additionnés de 10 μL d'ADN plasmidique (Sambrook *et al.*, 1989). Finalement, les cellules transformées et suspendues dans un volume total de 6 mL de milieu 2YT, contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline, ont été agitées à 250 rpm, à 37°C, pour la nuit.

Le lendemain, l'ADN plasmidique "muté" a été extrait et purifié selon la méthode classique de lyse alcaline, suivie d'une triple extraction au phénol, phénol:chloroforme, chloroforme. Après précipitation et lavage à l'EtOH, le culot a été redissout dans 100 μ L de TE additionné de RNase A (section 1.2.2). Une deuxième digestion *XmnI* a été effectuée sur 5 μ L de cet ADN, avec 10 U d'enzyme et dans un volume réactionnel de 20 μ L. Tel que décrit précédemment, 10 μ L de ce produit ont servi à transformer 100 μ L de *E. coli* XL1-BLUE compétentes additionnés de 500 μ L de 2YT sans antibiotique. Après une agitation de 45 min à 150 rpm et à 37°C, les 600 μ L de cellules transformées ont été étalés sur des géloses de 2YT contenant de l'ampicilline (5 géloses à 100 μ L et deux géloses à 50 μ L). Ces dernières ont été incubées à 37°C, pour la nuit. Le lendemain, une vingtaine de colonies choisies au hasard ont été repiquées dans des éprouvettes contenant 2 mL de 2YT + ampicilline et incubées pour la nuit.

4.1.2 Criblage des transformants par digestions enzymatiques

Les clones choisis ont été purifiés par lyse alcaline classique et l'ADN plasmidique obtenu fut redissout dans 50 μ L d'eau. Le criblage des transformants a été effectué par digestion enzymatique avec *BamHI* (5 μ L d'ADN + 5 U enzyme, dans 10 μ L de tampon #3 1X de Boehringer Mannheim) durant 1 h à 37°C. Une fois additionné de tampon d'alourdissement, le volume total a été soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% dans du tampon TAE. Les transformants étaient repérés par

l'apparition de deux bandes sur le gel (un site *Bam*HI provenant de la mutagénèse, et un second site appartenant à la région de clonage multiple du vecteur); alors que les génomes sauvages étaient seulement linéarisés (site unique provenant du vecteur).

Comme vérification supplémentaire, les transformants ont été soumis à la digestion de *Xmn*I et de *Eco*RI. Ceux-ci ne devaient pas être affectés par la première digestion puisque le site unique du vecteur avait été aboli par mutagénèse, mais devaient être linéarisés par *Eco*RI puisque le site naturellement présent dans le PPV avait été transformé par mutagénèse et que seul demeurait le site présent dans le vecteur.

4.1.3 Vérification par séquençage

La vérification définitive de deux transformants choisis (#11 et #22) et du clone P17 comme contrôle a été faite par le Service de séquençage de l'IAF. Suite à la préparation des ADN par Magic MiniPrep de Promega, le séquençage manuel par la méthode "dideoxy" (Sanger *et al.*, 1977), et en utilisant la trousse "T7 sequencing kit" de Pharmacia, a été effectué par incorporation de [α -³⁵S]-dATP. L'amorce PPV-pr43: 5' TTGGTCTCCTTCTGTGGTAGGTT 3' (position 3715-3693), complémentaire à la séquence du brin + du PPV, a été choisie à proximité du site *Eco*RI du virus.

4.1.4 Transfections de cellules eucaryotes

Ayant en main un génome muté et théoriquement infectieux du PPV, des essais de transfections de cellules eucaryotes ont été entrepris dans le but de générer un véritable PPV mutant, pouvant servir de contrôle interne lors de toutes les expériences relatives à la PCR quantitative. La technique utilisant le précipité ADN-phosphate de calcium formé en tampon HEPES, décrite dans *Current Protocols in Molecular Biology* (CPMB, unité 9.1), a été employée lors de ces essais. Deux types de cellules porcines ont servi de substrats: PT et PFT, ces deux lignées supportant généralement très bien la croissance du PPV. A chacun des essais, des infections ou transfections utilisant le virus PPV-NADL-2 et le clone infectieux P17 accompagnaient, à titre de contrôles, les manipulations des transformants #11 et #22 séquencés précédemment. Les cellules et le virus ont été obtenus du Service de diagnostic vétérinaire (voir 1.1).

Succinctement, environ 10 µg d'ADN plasmidique précipité au $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ étaient déposés sur un feuillet cellulaire, à 60% confluent, dans des flacons de 25 cm². Après un contact de 4 h à 37°C sans CO₂, le précipité était vidangé et remplacé par 10 mL de milieu frais (D-MEM + 0,3 mg/mL glutamine + 0,1% PenStrep⁷ + 10% SFB, dans le cas des PFT; D-MEM + 1% pyruvate + 1% acides aminés non essentiels + 0,1% PenStrep + 10% SFB, dans le cas des PT). Lorsque les cellules parvenaient à

⁷ PenStrep à 0,1%: pénicilline à 100 U/mL et streptomycine à 50 µg/mL.

confluence, elles étaient redivisées en deux flacons de 25 cm² contenant 10 mL de milieu frais et incubées, sous observation. À certaines occasions, un deuxième passage sur cellules était effectué en gelant et dégelant trois fois le feuillet cellulaire initial et en adsorbant 1 mL du surnageant clarifié, pendant 2h à 37°C, sur des cellules confluentes. Le volume était ensuite complété à 10mL avec du milieu frais contenant 2% de SFB.

Pour le contrôle PPV, 10 µL de virus titrant 10^{7,2}/50µL (dilués dans 0,5 mL de PBS stérile) étaient adsorbés, 2h à 37°C sans CO₂, sur un feuillet cellulaire à 60% confluent (flacon de 25 cm²). Puis, le tout était additionné de 10 mL de milieu frais et remis à incuber jusqu'à obtention d'un effet cytopathique évident.

4.1.5 Évaluation des transfections

L'efficacité des transfections (et des infections) a été évaluée par observation de l'ECP et par titrage HA. Dans ce dernier cas, des dilutions sériées (en log 2) de 25 µL de surnageants cellulaires étaient testées *versus* 50 µL d'hématies de cobaye diluées à 0,45% dans du PBS. Certains surnageants de premiers et de deuxième passages cellulaires ont aussi été analysés par PCR, quant à la présence de PPV, selon les conditions mises au point lors du développement de la PCR quantitative.

4.2 PCR compétitive

4.2.1 Conditions de PCR

La région du génome viral destinée à la PCR compétitive devait répondre à trois critères. Premièrement, à l'évidence, cette région devait recouvrir le site de restriction *EcoRI* présent chez les PPV sauvages, et muté en site *BamHI* chez le standard interne. Deuxièmement, les séquences prévues pour les amorces devaient être conservées autant pour les souches pathogènes que non pathogènes du virus, de telle sorte que la PCR compétitive puisse s'appliquer à tous les types d'échantillons cliniques. Finalement, l'amplicon généré devait être suffisamment court pour assurer une amplification robuste, mais suffisamment long pour obtenir deux fragments aisément distinguables sur gel d'agarose, après coupure de l'amplicon par les enzymes de restriction précitées. Cette dernière considération n'avait pas d'impact sur l'ELISA subséquent, mais était fort utile lors de la mise au point de la méthode.

L'amorce "anti-sens" PPV-pr43, utilisée lors du séquençage des clones mutants (section 4.1.3), a été choisie conjointement à l'amorce "sens" PPV-pr39b (position 3319-3341: 5' b-TGCAAGCTTAATGGTCGCACTAG). Cette dernière était biotinylée en 5' afin de permettre, ultérieurement en ELISA, la capture des amplicons sur les cupules enduites de streptavidine. Suite à l'amplification, les produits de PCR devaient

avoir une longueur de 397 pb et générer des sous-produits de 126 et 271 pb après coupure par *EcoRI* ou *BamHI*. Des versions biotinylées des amorces pr-6 et pr-10 (fragment de 1232 pb généré en PCR différentielle) ont aussi été utilisées en cours de développement des méthodes de PCR quantitative et d'ELISA.

Essentiellement, les conditions d'opération adoptées correspondaient à celles définies lors de la PCR différentielle; sauf que dans ce cas-ci, une seule paire d'amorces servait à amplifier indistinctement les génomes sauvage et mutant du PPV. De plus, comme ces amorces étaient parfaitement complémentaires à l'ADN cible (alors que des mésappariements volontaires servaient à discriminer les souches de PPV), la température d'hybridation était augmentée de 10°C (55°C).

Différents essais avec le standard interne, seul ou en association avec un extrait de foetus porcin négatif au PPV, ont servi à évaluer l'impact de possibles inhibiteurs, et à établir le seuil de sensibilité de la méthode en fonction du nombre de cycles d'amplification. Ainsi, lors de l'analyse d'une trentaine de cas cliniques, 500 copies de standard interne ont été ajoutées systématiquement à chacun des échantillons avant de soumettre ceux-ci à 30 cycles de PCR compétitive. Une fois la réaction complétée, les produits générés étaient analysés sur gel d'agarose, puis testés en ELISA. Advenant le cas de réponses excessives, on procédait à la réamplification des produits de PCR.

4.2.2 Réamplification de produits de PCR

Règle générale, lors de la réamplification de produits de PCR, 1 μ L de la première réaction était soumis à une deuxième ronde d'amplification, aux mêmes conditions et dans un volume total de 50 μ L. Cependant, la réaction était réduite à quelques cycles, habituellement entre 1 et 5. À certaines occasions, des dilutions plus poussées des produits de PCR initiaux étaient comparées à la réamplification afin d'éprouver l'exactitude du système. Enfin, les données obtenues par réamplification ont servi à l'étude des variations d'efficacité, en fonction du nombre de cycles et de la quantité initiale d'ADN cible.

4.2.3 Purification et estimation de produits de PCR

Afin de relier l'intensité de la réponse obtenue en ELISA à des quantités précises d'amplicons, il était nécessaire d'établir une courbe standard à partir de quantités connues de produits de PCR. Pour ce faire, la mesure de l'absorbance à 260 nm servait de référence. Cependant, il était impératif que ces produits de PCR soient exempts de dNTP et d'amorces résiduelles afin de ne pas fausser la lecture. Deux systèmes de purification ont donc été évalués après utilisation selon les recommandations des manufacturiers: Magic™ PCR Preps de Promega (cat. #A7170) et Centricon-100 d'Amicon (cat. #4212).

Dans le premier cas, la purification a été effectuée grâce à une résine (dérivé de gel de silice, de composition non divulguée) fixant efficacement l'ADN double-brin de plus de 200 pb. Après élimination des impuretés, les produits de PCR étaient élués de la colonne à l'aide d'eau ou de tampon TE. Dans le second cas, les amplicons étaient récupérés après filtration sur une membrane dont la porosité assurait l'élimination des nucléotides libres, des amorces et des ADN double-brin de moins de 125 pb ("cut-off" moléculaire de 100 kDa). Dans tous les cas, les produits de PCR purifiés étaient ensuite évalués par spectrophotométrie et électrophorèse sur gel d'agarose.

4.3 Système de détection de format ELISA

4.3.1 Principe et méthode

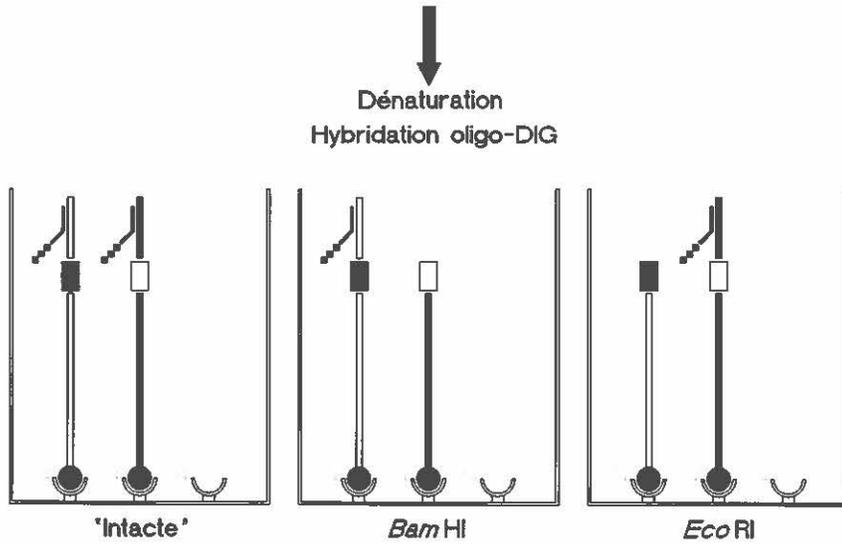
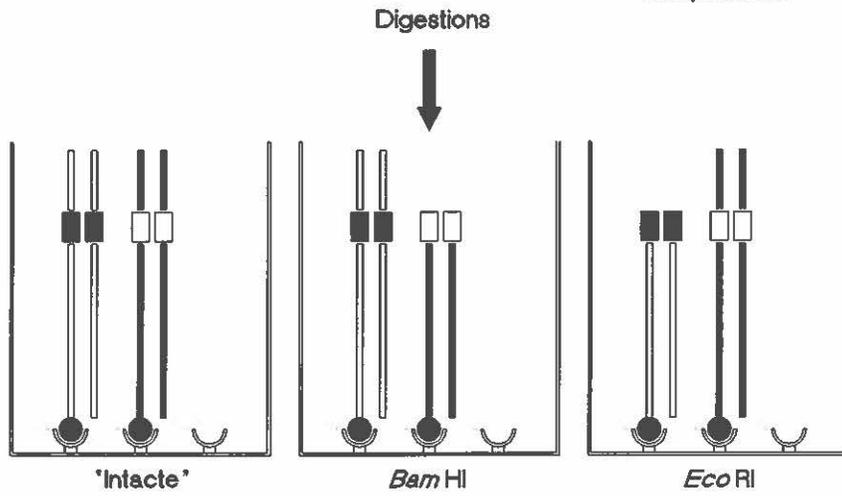
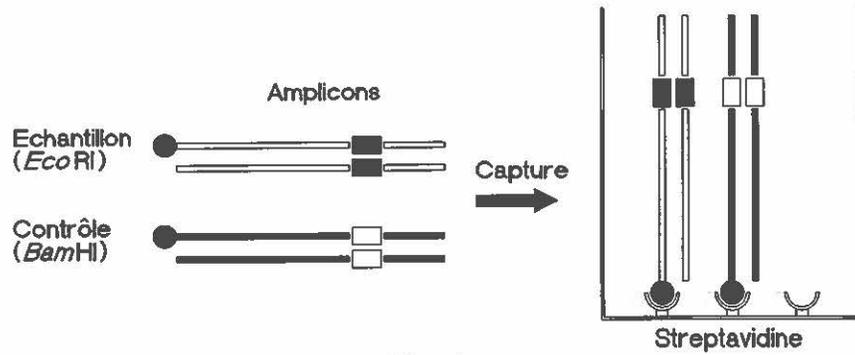
Les amplicons générés par PCR compétitive représentaient une population mixte, mélange de standard interne et de PPV sauvage. Tous ces produits de PCR étaient biotinylés à l'extrémité 5' du brin allongé à partir de l'amorce PPV-pr39b et ne se distinguaient les uns des autres que par la présence d'un site de restriction différent. En utilisant des micro-plaques de polystyrène enrobées de streptavidine, il devenait possible de capturer ces produits marqués à la biotine. Afin de discriminer les deux sous-populations d'ADN, chaque échantillon occupait un minimum de trois cupules sur le plateau (ce nombre pouvant être multiplié dans l'optique d'un triplicata, par exemple).

La première cupule n'était soumise à aucune digestion enzymatique et représentait donc la totalité des amplicons, standard interne et PPV sauvage. La seconde cupule, sous l'action de *Bam*HI, conservait les amplicons sauvages intacts, mais retrouvait les amplicons du standard interne tronqués au site de restriction. Inversement, la troisième cupule, sous l'action de *Eco*RI, conservait les amplicons du standard interne intacts, mais retrouvait ceux du génome sauvage tronqués au site de restriction (Figure 5). Une fois les différentes digestions complétées, le plateau était soumis à une série de lavages, et les ADN bicaténaires immobilisés étaient alors dénaturés par ajout de NaOH à 0,25 M. Suite à une autre série de lavages, les ADN monocaténaires restants (brins biotinylés) étaient hybridés à une courte sonde moléculaire dont la queue en 3' incorporait des molécules de digoxigénine. Cette sonde était dessinée de façon à être complémentaire à une portion de séquence située en aval des sites de restriction *Eco*RI ou *Bam*HI. De telle sorte qu'elle puisse s'hybrider tant au génome mutant qu'au génome sauvage, en autant que les dits génomes n'aient pas été tronqués par digestion enzymatique.

Après une nouvelle série de lavages, toutes les cupules étaient additionnées d'un sérum anti-Dig conjugué à la peroxydase. Une fois le contact terminé, et suivant d'autres lavages, le substrat H₂O₂ et le chromogène TMB étaient ajoutés à tous les puits. Sous l'action de la peroxydase, le substrat libérait l'oxygène qui, à son tour, oxydait le chromogène pour finalement produire une coloration bleue. La réaction était

Figure 5

Représentation schématique de l'ELISA appliquée aux produits de PCR. Les amplicons provenant de l'échantillon (lignes creuses) et ceux provenant du standard interne (lignes pleines) sont capturés sur les cupules enduites de streptavidine, via l'extrémité 5' de leurs brins portant une biotine (cercle noir). Les sites de restriction sont représentés par des encadrés blancs (*Bam*HI) et noirs (*Eco*RI). Chaque échantillon occupe un minimum de trois cupules: intacte, soumise à *Bam*HI et soumise à *Eco*RI. Dans des conditions idéales, l'absorbance de la cupule intacte devait égaler la somme des absorbances obtenues avec les cupules soumises aux digestions enzymatiques.



Anti-DIG (POD)
TMB + H₂O₂
D.O 450nm

subséquentement stoppée par addition de H_2SO_4 , et la coloration jaune produite était mesurée par lecture de la densité optique à 450 nm. L'intensité de la réaction était directement proportionnelle à la quantité de peroxydase liée et, par voie de conséquence, au nombre d'amplicons présents dans la cupule. Le signal généré par la première cupule de chaque échantillon, non exposée aux enzymes de restriction, représentait la totalité de l'ADN. Alors que le signal produit par la deuxième cupule, soumise à *Bam*HI, représentait la quantité d'ADN de type sauvage; et inversement, le signal produit par la troisième cupule, soumise à *Eco*RI, représentait la quantité d'ADN muté (standard interne). Dans des conditions optimales, la somme des signaux obtenus avec les cupules "digérées" devait égaler le signal retrouvé dans la cupule intacte. Si tel n'était pas le cas, ce contrôle pouvait indiquer des digestions incomplètes ou encore, la présence d'hétéroduplex formés en cours de PCR.

Enfin, lors de chaque test, une série de cupules était destinée à recevoir un produit de PCR connu, purifié et dosé; tel que décrit à la section 4.2.3. Règle générale, ce produit était un assemblage de plusieurs réactions obtenues avec les mêmes amorces ayant généré les produits de PCR analysés en ELISA. Le type d'ADN de départ (Kresse, NADL-2, ou mutant) était sans importance puisque ces cupules n'étaient pas soumises aux enzymes de restriction, mais servaient uniquement à établir une courbe standard d'absorbance. Des dilutions sériées, en log 2, déterminaient l'axe des concentrations. Ainsi, les DO relatives aux échantillons pouvaient être converties en

quantité finale d'ADN. De plus, connaissant la quantité initiale de standard interne, la quantité finale de ce dernier permettait de quantifier l'efficacité d'une réaction de PCR donnée. Enfin, le rapport échantillon sur standard interne (ADN "sauvage" / ADN muté) permettait la pondération des résultats intra et inter analyses tout en jetant les bases d'un "cut-off" diagnostic (seuil de positivité tenant compte de la méthode de détection).

4.3.2 Marquage et dosage de sondes moléculaires

Toutes les sondes utilisées au cours de cette recherche ont été fabriquées à l'aide de la trousse "DIG Oligonucleotide Tailing Kit" de Boehringer Mannheim (cat. #1417-231), alors que les oligonucléotides provenaient du Service de synthèse des oligonucléotides de l'IAF. Les molécules d'acide nucléique étaient marquées de façon non isotopique par incorporation en 3' de Dig-dUTP, et ce, grâce à l'enzyme TdT. Dans cette réaction, des nucléotides marqués et des dATP non marqués étaient combinés dans un rapport de 1 pour 10 afin de maximiser l'incorporation de Dig, tout en conservant un espacement optimal des haptènes. En suivant les recommandations du fabricant, on pouvait s'attendre à la génération d'une queue d'une longueur moyenne de 50 nt contenant 10% de Dig-dUTP.

Succinctement, 8 μ L de tampon d'élongation étaient combinés sur glace à 8 μ L de CoCl_2 25 mM et 250 pmol d'oligonucléotide choisi. À ce mélange s'ajoutaient 2 μ L

de Dig-dUTP à 1 mM, 2 μ L de dATP à 10 mM, 100 U de TdT et un volume d'eau totalisant 40 μ L. Après incubation de 15 min à 37°C, le tube était replacé sur glace. La réaction était stoppée par ajout de glycogène en solution dans de l'EDTA à 0,02 M (concentration finale). Le tout était précipité à l'aide de LiCl (0,4 M: [C] finale) et d'EtOH, rincé à l'EtOH 70%, séché sous vide, puis reconstitué dans 250 μ L d'eau. Théoriquement, la concentration finale de sonde était donc de 1 pmol/ μ L.

Dans les faits, les rendements étaient inférieurs et nécessitaient une évaluation plus précise. Pour ce faire, une adaptation du protocole accompagnant la trousse "DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive" de Boehringer Mannheim (cat. #1093-657) était utilisée. Brièvement, différentes concentrations de sonde marquée étaient directement déposées sur une membrane de nylon: 2 μ L et 1 μ L de solution mère, puis 1 μ L de dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} . Parallèlement, des aliquotes identiques de l'oligonucléotide contrôle fourni avec la première trousse ("DIG Oligonucleotide Tailing Kit") étaient aussi déposées sur la membrane. Ce contrôle contenait 2,5 pmol/ μ L d'oligonucléotide marqué par incorporation de Dig-dUTP/dATP. L'ADN était ensuite fixé par irradiation aux UV sur un transilluminateur, durant 4 min. Puis la membrane était bloquée avec 10 mL de tampon #2 (0,5% d'agent bloquant inclus dans la trousse et dissout dans le tampon #1: Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) durant la nuit, et subséquentement lavée avec du tampon #1. Suivaient une incubation de 30 min dans 20 mL de sérum anti-Dig conjugué à la phosphatase alcaline (150 mU/mL), puis 2

lavages de 15 min dans le tampon #1. La membrane était ensuite équilibrée durant 2 min dans 20 mL de tampon #3 (Tris-HCl 100mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM; pH 9,5), avant d'être incubée dans 10 mL du même tampon contenant 45 µL de NBT et 35 µL de X-phosphate (inclus dans la trousse). Lorsque le développement de couleur était satisfaisant, la réaction était finalement bloquée par immersion de la membrane dans du tampon TE à pH 8,0. La comparaison *versus* la sonde contrôle, à l'aide des dilutions limites, permettait une évaluation fine de la sonde de travail.

4.3.3 Conditions d'opération

Le développement de la méthode ELISA a nécessité l'évaluation de nombreux paramètres: on trouvera au chapitre des Résultats une description détaillée du protocole adopté et les données ayant motivé ce choix. Pour l'instant, qu'il suffise de souligner les principaux essais effectués.

Tout d'abord, deux plateaux de type "high binding" furent évalués: Immulon 4 de Dynatech Laboratories (cat. #011-010-3855) et Maxisorp Immuno Module U16 de Nunc (cat. #4-64394). Des enrobages d'avidine et de streptavidine, à différentes concentrations et en utilisant des tampons "carbonate" (pH 9,6) ou PBS (pH 7,4), furent essayés. Le blocage subséquent consistait en PBS-Tween 20 contenant 1% de BSA. Cependant, d'autres agents bloquants ont été abordés en cours de développement: lait écrémé, caséine et sérum de cheval.

La capture de l'échantillon demanda l'évaluation de la quantité optimale de produit de PCR à utiliser, de façon à obtenir une intensité de réponse convenable tout en évitant la saturation de l'enrobage par les amorces biotinylées non utilisées lors de l'amplification. La restriction enzymatique par *EcoRI* et *BamHI* fut testée de plusieurs façons: directement dans le plateau sur les amplicons immobilisés, ou conjointement à l'immobilisation; ou encore, en tubes Eppendorf (1,5 mL) avant la capture sur plateau. Les périodes d'incubation, les concentrations d'enzyme et les volumes réactionnels ont été surveillés.

La dénaturation des amplicons se faisait par ajout de NaOH 0,25 M, 10 min à la température de la pièce. Suivait l'hybridation de la sonde dans du 0,5X SSPE (75 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM EDTA). La sonde PPV-pr44 (position 3683-3660) 5' GTTTTGGAGGCAGTCCTAGAGATC-Dig était utilisée lors de la PCR quantitative. La sonde PPV-pr40, 5' GAAATGGTCCACCATTGGAGTATTC-Dig (position 3866-3842) a servi à la mise au point de la méthode, mais s'adressait plus spécifiquement à des amplicons générés par PCR différentielle. Pour chacune des sondes, les températures d'hybridation et les concentrations optimales ont été évaluées.

Suite à l'hybridation de la sonde, deux systèmes immunologiques ont été envisagés: d'abord, une révélation directe par un sérum de mouton anti-Dig conjugué à la peroxydase (Boehringer Mannheim, cat. #1207-733); puis, une révélation indirecte

par un sérum de mouton anti-Dig, suivi d'un sérum de chèvre anti-mouton conjugué à la peroxydase (Boehringer Mannheim, cat. #1333-089 et #1301-977). L'ajout de H_2O_2 comme substrat et de TMB comme chromogène complétait la réaction. Celle-ci était finalement stoppée par addition de 2 N H_2SO_4 , et la lecture se faisait à 450 nm contre des "blancs" ne contenant pas d'acide nucléique.

Enfin, des tests supplémentaires ont été exécutés afin de vérifier la spécificité de la méthode (vs PPV non biotinylé et HPV biotinylé), la stabilité de l'enrobage et l'intégrité des produits de PCR purifiés servant à établir la courbe standard d'absorbance.

5. ÉTUDE DES CAS CLINIQUES

5.1 Préparation des échantillons

Afin de déterminer la meilleure façon d'extraire le PPV des échantillons cliniques, cinq méthodes ont été pratiquées et testées en parallèle dans des conditions de PCR différentielle et quantitative. Trois spécimens (deux foetus momifiés et un avorton) reconnus positifs par IF et culture cellulaire, utilisés seuls et additionnés de 50 μ L de PPV-NADL-2 (titrant $10^{7.2}/50\mu$ L) ont servi de matériel de base à l'étude. Comme contrôle, 100 μ L de suspension virale seule étaient extraits selon les mêmes méthodes.

5.1.1 *Méthode Hirt modifiée*

La méthode décrite par Hirt (1967) et adaptée au PPV par Molitor et collaborateurs (1984) a été utilisée comme suit. Environ 100 mg de tissus étaient triturés au scalpel et suspendus dans un volume (100 μ L) de tampon STE (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7,5). Quatre volumes de tampon de lyse (0,75% SDS, 1,25 M NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7,5 et 250 μ g/mL de protéinase K) étaient ajoutés, et le tout était incubé un minimum de 2h à 37°C avec agitation régulière au vortex afin d'assurer la digestion la plus complète possible. La suspension gélatineuse obtenue était déposée sur de la glace fondante pendant un minimum de 2h, puis centrifugée 30 min à 12 000 x g à 4°C afin de sédimenter les débris cellulaires et l'ADN chromosomique associé aux histones. Le surnageant était transféré dans un tube propre et centrifugé une seconde fois, aux mêmes conditions. Une fois récupéré dans un nouveau tube, l'ADN viral présent dans le surnageant était précipité à l'aide de deux volumes d'EtOH, pendant 1h à -70°C. Après centrifugation, le culot était rincé à l'EtOH 70%, séché sous vide et resuspendu dans 400 μ L de TE pH 8,0 contenant 100 μ g/mL de RNase A. Suivant une incubation de 1h à 37°C, l'ADN viral était récupéré par une triple extraction au phénol, phénol:chloroforme, chloroforme et précipité à l'éthanol tel que décrit précédemment. Finalement, le culot était redissout dans 100 μ L de tampon TE à pH 8,0.

5.1.2 Méthode à base de thiocyanate de guanidine

L'extraction au phénol-chloroforme-GuSCN en milieu acide a été décrite par Chomczynski et Sacchi (1987) afin d'isoler, en une seule étape, l'ARN dans la phase aqueuse. Afin de vérifier si les formes répliquatives du PPV, qui se comparent à des plasmides super-enroulés, pouvaient aussi se retrouver dans cette phase de l'extraction, la procédure a été appliquée aux échantillons cliniques. Pour ce faire, environ 100 mg de tissus ont été triturés au scalpel et resuspendus dans 500 μ L de solution dénaturante (4 M GuSCN, 0,1 M 2-ME, 0,5% Sarkosyl, 25 mM citrate de sodium à pH 7). Après agitation vigoureuse, 50 μ L d'acétate de sodium 2 M à pH 4, 500 μ L de phénol et 100 μ L de chloroforme étaient successivement ajoutés, en ayant soin d'agiter au vortex entre chaque addition. Le tout était déposé 15 min sur de la glace fondante, puis centrifugé 30 min à 12 000 x g à 4°C. La phase aqueuse était ensuite récupérée et l'éventuel ADN viral précipité par ajout d'un volume égal d'isopropanol (1h à -20°C). Après centrifugation de 30 min à 12 000 x g, le culot était séché sous vide et redissout dans 100 μ L de TE à pH 8,0.

5.1.3 Trousse "Elu-Quik"

La trousse "Elu-Quik DNA Purification Kit" (Schleicher & Schuell #74450), utilisant un tampon de lyse à base de thiocyanate de guanidine et des particules de verre

en association avec du perchlorate de sodium pour capturer l'ADN, a été évaluée en regard de l'extraction du PPV. Les recommandations du fabricant quant à "l'isolement d'ADN de moins de 50 kb" ont été suivies. Environ 100 mg de tissus ont été triturés dans 1 mL de PBS, puis centrifugés à basse vitesse. Après vidange du tampon, l'homogénat a été resuspendu dans le PBS résiduel additionné de 40 µL de tampon de lyse. Après un vortex vigoureux, 280 µL de tampon de capture et 25 µL de particules de verre ont été ajoutés. Un contact de 10 min à température de la pièce a suivi, en agitant délicatement et occasionnellement le mélange. Après centrifugation de 30 sec à 7 000 x g et élimination du surnageant, ont suivi deux lavages avec 500 µL de tampon à cet effet. Le culot a ensuite été resuspendu dans 500 µL de tampon réduisant la concentration en sels, puis centrifugé 2 min à 7 000 x g et le surnageant éliminé. L'opération fut répétée et le culot resuspendu dans 50 µL de TE afin d'éluer l'ADN. Après une incubation de 15 min à 50°C, le tout a été centrifugé 30 sec à 7 000 x g et le surnageant mis de côté. Cette étape a été répétée avec un autre 50 µL de TE, et le second éluat a été combiné au premier.

5.1.4 Lyse alcaline rapide

La méthode d'extraction par lyse alcaline rapide de l'échantillon a été décrite dans PCR: Clinical Diagnostics and Research (chap. 7). Environ 100 mg de tissus ont été triturés au scalpel et additionnés d'un volume équivalent d'eau, pour être ensuite

rapidement gelés et dégelés à deux reprises. Un volume de NaOH 50 mM, égal à celui de la suspension cellulaire (200 μ L) a été ajouté et le tout fut agité vigoureusement au vortex, jusqu'à homogénéisation la plus complète possible. Après une légère centrifugation, la suspension a été recouverte de 150 μ L d'huile minérale légère et le tube fut incubé 10 min à 95°C. Afin de neutraliser le milieu, 32 μ L de Tris-HCl 1M à pH 7,0 ont été ajoutés sous la couche d'huile (8 μ L de Tris/50 μ L de NaOH).

5.1.5 Protéinase K rapide

Lors de cette procédure, environ 100 mg de tissus ont été triturés au scalpel et resuspendus dans 500 μ L de PBS auxquels un volume équivalent de tampon de lyse a été ajouté (10 mM EDTA, 150mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5). De la protéinase K, à 20 μ g/ μ L H₂O, a été additionnée à la suspension de façon à obtenir une concentration finale de 500 μ g/mL. Le tout a été incubé au bain-marie, à 37°C, pour la nuit. Le lendemain, le tube était agité vigoureusement au vortex de façon à obtenir une lyse complète. Finalement, l'enzyme était inactivé par incubation de 15 min à 95°C, et le tube légèrement centrifugé.

Une variante de cette procédure a été adoptée pour la préparation généralisée des échantillons cliniques. Environ 50 mg de tissus ont été triturés et resuspendus dans 1 mL de tampon de PCR 1X + 500 μ g de protéinase K. La suite de la manipulation est demeurée identique.

5.2 PCR différentielle et PCR quantitative

La totalité des échantillons cliniques a été analysée par PCR différentielle, et ce, selon les conditions finalement adoptées suite à la mise au point de la méthode. De la même façon, une trentaine de cas du champ ont été testés par PCR quantitative.

5.3 "Southern Blot"

Quelque cinquante échantillons cliniques (positifs au PPV en IF, mais négatifs en PCR différentielle) ont été amplifiés par PCR "classique" et analysés par transfert de type Southern. Les conditions d'amplification correspondaient à celles adoptées suite à la mise au point de la PCR quantitative, sauf que les amorces choisies couvraient la région correspondante à la répétition de 127 nt, sise à l'extrémité 5' du génome PPV. L'amorce PPV-pr6 a été précédemment décrite (section 2.1), alors que l'amorce pr7 couvrait la séquence CAATACTGCACCTGTATTTCCAAATG (4171-4196) du brin positif PPV.

L'appareil utilisé pour le transfert était un Vacu-Blot de Pharmacia, dont le vacuum était fixé à 50 mBar. Brièvement, le gel d'agarose était déposé sur une membrane de nylon activé (Biotrans, 0,45 µm, ICN) précédemment hydratée d'eau, puis de 20X SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrate de sodium, pH 7,0). La dénaturation de l'ADN

était effectuée avec du NaOH 0,5 N / NaCl 0,015 M, et la neutralisation avec du Tris-HCl, 1 M à pH 7,4 / NaCl 1,5 M. Le transfert comme tel s'opérait à l'aide de SSC 20X, durant une trentaine de min, à la température de la pièce. Une fois la membrane rincée au SSC, l'ADN était fixé par irradiation UV pendant 5 min sur un transilluminateur. La préhybridation de la membrane, 2h à 42°C dans un four rotatif, nécessitait 20 mL de solution contenant, entre autre, 50% de formamide (Sambrook *et al.*, 1989). Ceci fait, 15 mL étaient retirés et 5 µL de sonde radio-marquée ([C] finale: 10⁶ cpm/mL) étaient ajoutés aux 5 mL restants de solution de préhybridation. La sonde a été gracieusement fournie par Dr J. Bergeron et correspondait au clone P17 marqué aléatoirement avec [α -³²P]-dCTP. L'hybridation se faisait à 42°C, durant la nuit, dans le four rotatif. Le lendemain, après trois séries de trois lavages au SSC (2X, 1X, 0,2X SSC) contenant 0,1% de SDS, l'autoradiographie était effectuée sur film Kodak XAR, dans une cassette avec écran amplificateur. Le tout était placé à -70°C pour la nuit ou plus longtemps, si nécessaire. Une fois l'exposition terminée, le film était développé automatiquement au moyen de l'appareil X-Omat M20 Processor de Kodak.

RÉSULTATS

1. PCR DIFFÉRENTIELLE

1.1 Conditions préliminaires

Partant du principe que les amorces constituent la pierre angulaire d'une réaction de polymérisation en chaîne, la mise au point de la PCR différentielle emprunta la démarche suivante: d'abord déterminer un ensemble d'amorces capables de distinguer les génomes pathogène et non pathogène du PPV, puis raffiner le système afin d'en assurer la robustesse. Les premiers tests ont donc été effectués dans des conditions de PCR tout à fait "classiques". Le tampon d'amplification et la polymérase *Taq* provenaient de Bio/Can. Le premier assurait une concentration finale en $MgCl_2$ de 1,5 mM, et la seconde était utilisée à 1U par réaction de 50 μ L. Les dNTP étaient présentes à une concentration finale de 200 μ M et chacune des amorces totalisait 25 pmol (0,5 μ M). Les clones P17 (NADL-2) et K5R12 (Kresse) servaient d'ADN cible, chacun étant utilisé à 4 ng par réaction de 50 μ L.

Cependant, afin de favoriser la nature différentielle du système, nous avons opté dès le départ pour une procédure de "hot start" employant une barrière de paraffine, plutôt que l'assemblage complet des réactifs à la température de la pièce. Les dNTP, l'ADN et la moitié du tampon 10X se retrouvaient dans le cocktail inférieur totalisant 25 μ L. Après ajout d'une pastille de cire, le tout était incubé 5 min à 95°C, pour

finalement revenir à la température ambiante. Sur la paraffine figée étaient déposés les 25 μ L du cocktail supérieur, contenant les amorces, la *Taq* et l'autre moitié du tampon 10X. Les tubes étaient alors positionnés dans le thermocycleur et soumis au profil suivant: 1 min de dénaturation à 94°C, 1 min d'hybridation à 45 ou 55°C, puis 1 min d'élongation à 72°C. Le tout était répété 34 fois, alors que le 35^e cycle comportait une élongation finale de 10 min.

1.2 *Choix des amorces*

La première stratégie envisagée employait les amorces extérieures pr6 et pr10, complémentaires tant au génome virulent qu'avirulent du PPV. À cause de la répétition ou non de 127 nt, située tout près de l'extrémité 3' du génome viral, ces amorces devaient générer un fragment de 1232 pb avec la souche NADL-2 et un fragment de 1105 pb avec la souche Kresse. Différentes versions de pr28 et pr29 servaient d'amorces intérieures et étaient respectivement destinées à s'hybrider au génome virulent et avirulent du PPV. Les versions M1 (voir Mat. et Méth. 2.1, Tableau 4) étaient parfaitement complémentaires à leur ADN cible correspondant, alors que les versions M2 et M3 comportaient un faux appariement à l'avant-dernier nucléotide en 3'. De ce fait, une amorce donnée présentait soit un, soit deux, mésappariements à l'extrémité 3' en regard du génome non correspondant. La combinaison de pr10 et pr28 devait générer un fragment de 353 pb avec la souche Kresse, alors que la combinaison de pr29 et pr6 devait générer un fragment de 937 pb avec la souche NADL-2 (Figure 6).

Figure 6

Première stratégie de PCR différentielle. L'amorce discriminante pr29 était dessinée en fonction d'un génome avirulent (NADL-2), alors que l'amorce discriminante pr28 s'adressait à un génome de type virulent (Kresse).

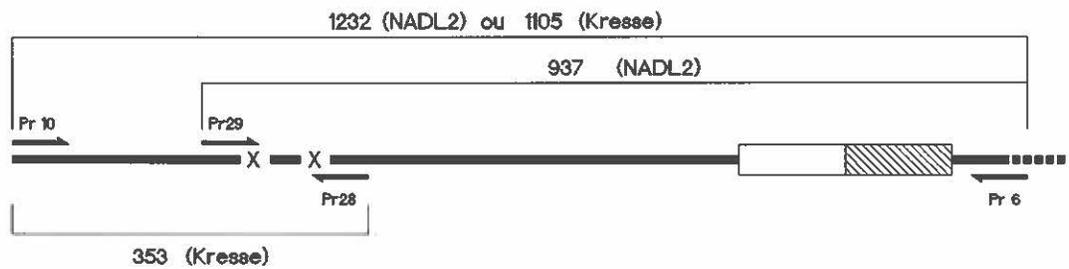
AVIRULENT (NADL2)



VIRULENT (Kresse)



PCR différentielle



Les différentes amorces ont été testées par paires, puis combinées à l'intérieur d'un même cocktail d'amplification; ceci en utilisant des températures de 45 et 55°C lors de l'hybridation. Les deux types d'ADN ont naturellement servi de substrats. Individuellement, chacune des paires d'amorces a donné le résultat escompté en regard de son ADN correspondant. Par contre, les amorces internes n'ont pu discriminer l'ADN non correspondant: seule pr29 M2 a réussi à éliminer le signal de 810 pb généré par Kresse avec les versions M1 et M3 (937 pb moins la répétition de 127 pb). De la même façon, les deux versions de pr28 ont efficacement amplifié un fragment de 353 pb avec NADL-2. Lorsque utilisées en combinaison de 4 amorces, ces dernières généraient relativement bien les fragments de type virulent en présence de Kresse, mais favorisaient l'amplicon de 353 pb aux dépens de celui de 1105 pb. À noter que ce phénomène était moins évident lorsque la version M2 de pr28 était utilisée. Par contre, les amorces spécifiques au génome avirulent ne causaient aucune interférence dans ce test. En présence de NADL-2, ces dernières généraient le signal de 937 pb accompagnant celui de 1232 pb, mais la coexistence des amorces spécifiques au génome virulent causait l'apparition systématique d'une troisième bande à 353 pb. Cette interférence était cependant plus faible lorsque pr28 M2 faisait partie du cocktail. Dans la grande majorité des cas, le fait d'augmenter la température d'hybridation à 55°C avait plus tendance à réduire l'intensité des signaux plutôt qu'à résoudre le problème de non spécificité comme tel.

Suite à ces résultats, une deuxième stratégie de PCR différentielle a été élaborée en exploitant davantage l'impact variable des mésappariements entre l'extrémité 3' des amorces et l'ADN cible. Cette fois, l'amorce interne pr34 devait amplifier le génome virulent (fragment de 810 pb), et trois versions de l'amorce interne pr35 devaient potentiellement amplifier le génome avirulent (fragment de 353 pb). Les amorces externes pr6 et pr10 étaient conservées (Figure 7). S'inspirant des résultats précédents, toutes les amorces discriminantes comportaient un faux appariement à l'avant-dernier nucléotide en 3'. De plus, les versions pr35(2) et pr35(3) dépassaient la mutation ponctuelle (sise à 3958) par une base non complémentaire au génome des PPV (Tableau 4). Ces dernières présentaient donc une finale de trois nucléotides non appariés à l'ADN de type virulent, ceci dans le but de carrément défavoriser l'omniprésent fragment de 353 pb.

Les différentes amorces ont été testées par paires, par trios (2 externes + 1 interne), puis toutes combinées à l'intérieur du même cocktail d'amplification. L'hybridation s'effectuait à 45°C, en utilisant les deux types d'ADN comme gabarit. Au départ, les amorces pr34 et pr35(1) assurèrent une excellente discrimination des ADN. Par moments, certaines traces d'amplicons non souhaités étaient présentes, mais l'amélioration ultérieure des conditions d'opération laissait présager la résolution de ce problème. Par contre, à l'intérieur du système "avirulent", la coamplification du fragment de 353 pb prenait nettement le pas sur celle du fragment de 1232 pb, au point

Figure 7

Deuxième stratégie de PCR différentielle. L'amorce discriminante pr34 était dessinée en fonction d'un génome virulent (Kresse), alors que l'amorce discriminante pr35 s'adressait à un génome de type avirulent (NADL-2).

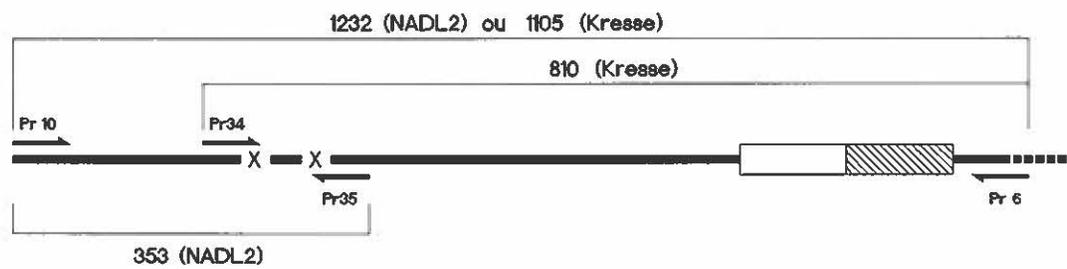
AVIRULENT (NADL2)



VIRULENT (Kresse)



PCR différentielle



d'éliminer régulièrement cette dernière. Ce phénomène avait été observé lors de la première stratégie de PCR différentielle, mais le fait, semble-t-il, d'utiliser l'ADN Kresse comme cible en réduisait nettement l'acuité.

Les versions 2 et 3 de l'amorce pr-35 ont donc été utilisées afin de fragiliser davantage l'hybridation et, par voie de conséquence, réduire l'efficacité de l'amplification du fragment de 353 pb. De plus, cette stratégie pouvait assurer une discrimination encore plus lourde de l'ADN non correspondant (Kresse). Suite à quelques essais, cette démarche a été abandonnée; l'amplification du petit fragment étant beaucoup trop erratique.

Enfin, quelques tests ont été effectués en utilisant les amorces extérieures pr32 et pr30 (Tableau 4). Dans un premier temps, le remplacement de pr10 par pr32 visait à vérifier si un tel changement pouvait améliorer l'efficacité générale de la PCR différentielle et éventuellement, favoriser l'expression du fragment de 1232 pb dans le système "avirulent". Le contraire se produisit: même l'amplicon de 1105 pb généré à partir de l'ADN Kresse avait tendance à disparaître au profit de celui de 810 pb. L'emploi de pr30, dans un deuxième temps, était destiné à évaluer l'effet possible de la répétition de 127 nt sur l'efficacité de l'amplification quant aux grands fragments de 1232 ou 1105 pb. Contrairement à pr6, cette amorce était positionnée en amont de la répétition, et la combinaison avec pr10 devait générer un fragment de 820 pb, quel que

soit l'ADN cible utilisé. Tel que vu lors des tests précédents, le signal produit à partir de Kresse était systématiquement plus intense que celui provenant de NADL-2. De plus, en combinaison de quatre amorces (pr10, pr30, pr34 et pr35), l'amplicon de 820 pb généré par NADL-2 s'éclipsait au profit de celui de 353 pb, alors que les deux amplicons générés par Kresse (820 et 525 pb) étaient à peu près équivalents. Bref, que l'amorce extérieure de droite soit située avant ou après la répétition de 127 nt ne résolvait pas la disparité de réponse entre les deux types d'ADN.

Suite à toutes ces données, il fut décidé de poursuivre l'étude de la PCR différentielle avec les amorces intérieures pr34 et pr35(1), en combinaison avec les amorces extérieures pr6 et pr10. Le raffinement subséquent des différentes conditions d'opération devait potentiellement améliorer le système et assurer une plus grande uniformité des résultats.

1.3 Température d'hybridation et concentration des amorces

Les oligonucléotides étant choisis, différents tests ont été menés afin de déterminer une température d'hybridation et des concentrations d'amorces adaptées au système différentiel. Les températures de fusion (T_m) théoriques étaient estimées à l'aide des trois formules suivantes (revue par Tijssen, 1993):

a) formule dite de Wallace où $T_m = 4(\text{nombre de GC}) + 2(\text{nombre de AT})$;

b) formule simplifiée de Meinkoth et Wahl où $T_m = 60 + 0,4(\%GC) - 500/\text{pb}$ de l'oligo;

c) formule complexe tenant compte de paramètres thermodynamiques dus à l'effet d'empilement des bases ("stacking") et à l'influence du "plus proche voisin", autant que des concentrations de l'amorce elle-même (0,5 μM) et de celle des cations monovalents du tampon. Normalement, on envisageait une température d'hybridation pour PCR de 5°C inférieure au T_m . De plus, la présence de mésappariements au niveau des amorces internes pouvait commander une température encore plus basse. Dans le cas des quatre amorces de PCR différentielle, on obtenait les T_m suivantes:

	pr6	pr10	pr34	pr35(1)
formule de Wallace	70°C	70°C	60°C	62°C
formule simplifiée de Meinkoth et Wahl	55°C	56°C	52°C	54°C
formule complexe (revue Tijssen, 1993)	52°C	53°C	52°C	50°C

Dans les faits, lors d'une hybridation à 45°C, les amorces internes discriminaient bien leur ADN cible respectif et tous les fragments de PCR attendus étaient amplifiés, quoique le signal de 1232 pb était sous représenté au profit de celui de 353 pb (NADL-2). À 55°C, en présence d'amorces externes seulement, les fragments de 1232 et 1105 pb étaient bien amplifiés. Mais en cocktail de quatre amorces, la matrice NADL-2 produisait une trace d'amplicons à 353 pb et aucun signal à 1232 pb; alors que la matrice Kresse conservait ses amplicons à 1105 pb tout en perdant ceux de 810 pb. La hausse de température ne résolvait donc pas la sous représentation de l'amplicon de 1232 pb et nuisait du même coup à l'hybridation des amorces contenant des

mésappariements. Il fut donc décidé de poursuivre la PCR différentielle en maintenant l'hybridation à 45°C, tout en jouant sur les concentrations individuelles des amorces afin d'uniformiser l'amplification des différents fragments.

L'expérience fut menée en deux temps: d'abord en augmentant la concentration des amorces externes, puis en diminuant celle des amorces internes. Dans le premier scénario, pr6 et pr10 étaient utilisées à 1,5 µM (trois fois la quantité usuelle), alors que pr34 et pr35(1) étaient à 0,5 µM. Cette modification n'a pas changé le tableau habituel: en présence des seules amorces extérieures, la matrice Kresse produisait un signal à 1105 pb nettement plus fort que celui généré par NADL-2 à 1232 pb. En cocktail de quatre amorces, les deux amplicons produits par Kresse (1105 et 810 pb) étaient à peu près équivalents, alors qu'avec NADL-2, le fragment de 1232 pb disparaissait presque systématiquement au profit de celui de 353 pb. La manipulation fut répétée en remplaçant pr6 par pr30 (amorce située avant la répétition de 127 nt et commune aux deux types d'ADN: amplicon de 820 pb). Les résultats sont demeurés essentiellement les mêmes.

Dans la deuxième approche, pr6 et pr10 ont été utilisées à une concentration finale de 0,5 µM, alors que les quantités de pr34 et pr35(1) allaient en décroissant pour finalement représenter des rapports amorces externes : amorces internes de 1:1, 5:1, 10:1, 25:1 et 50:1. En présence d'ADN Kresse, l'augmentation du rapport favorisait de

plus en plus le grand fragment au détriment du petit. Une concentration égale des différentes amorces donnait la coamplification la plus équilibrée. Avec la matrice NADL-2, le signal produit à 353 pb diminuait régulièrement avec la baisse de concentration des amorces internes, mais le fragment de 1232 pb demeurait faible ou inexistant.

Comme ni la hausse de la température d'hybridation, ni le jeu des concentrations d'amorces n'arrivaient à résoudre le problème de la sous représentation du fragment de 1232 pb chez NADL-2, des efforts de raffinement des conditions générales d'opération ont été entrepris afin d'améliorer l'efficacité globale de la PCR différentielle et, par là, permettre l'expression de l'amplicon récalcitrant.

1.4 Conditions d'opération

Au cours des essais suivants, les amorces pr6, pr10, pr34 et pr35(1) ont été utilisées à des concentrations équimolaires de 25 pmol/réaction de 50 µL, et la température d'hybridation était fixée à 45°C. La procédure de "hot start" utilisant une barrière de paraffine était conservée. Dans un premier temps, le tampon PCR de base (Bio/Can Scientific) a été comparé à un panel en échiquier de 20 tampons "maison" reprenant la composition du précédent, mais faisant varier le pH et la concentration finale en MgCl₂ de la façon suivante:

pH	Concentration finale en MgCl ₂ (mM)				
	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
8,5	#1	#2	#3	#4	#5
9,0	#6	#7	#8	#9	#10
9,5	#11	#12	#13	#14	#15
10,0	#16	#17	#18	#19	#20

Note: le tampon "maison" #6 correspond au tampon du manufacturier Bio/Can.

Avec les deux types d'ADN, les tampons à pH 8,5 ont donné les meilleurs résultats; l'intensité générale des bandes décroissant parallèlement à la hausse du pH. D'autre part, l'augmentation de la [C] en MgCl₂ avait tendance à nuire à la discrimination des ADN en permettant l'amplification du fragment de 353 pb chez Kresse. Le tampon "maison" #1 a donc été retenu lors des essais suivants.

Jusqu'à présent, tous les tests avaient été effectués en utilisant 1 U de polymérase *Taq* Bio/Can par réaction de 50 µL. Différentes concentrations d'enzyme ont donc été évaluées en prenant l'ADN NADL-2 comme matrice et le tampon #1 comme milieu. En utilisant 1, 2, 3, 4 et 5 U de *Taq*, l'intensité des fragments de 353 et 1232 pb augmenta parallèlement à la hausse de la [C] en enzyme, avec un certain plafonnement à partir de 3 U. Par contre, l'apparition de bandes non spécifiques, en particulier le fragment de 937 pb attribuable à l'amorce pr34 (destinée à amplifier Kresse), fut évidente à partir de 3U/réaction. L'ajout de 2 U de *Taq* représentait le meilleur compromis: l'amplicon de 1232 pb était présent et les bandes accessoires absentes.

Incidentement, la *Taq* de Pharmacia et l'*AmpliTaq* de Cetus ont été comparées à la *Taq* de Bio/Can, chacune dans leur tampon respectif. Utilisant 1 U par réaction de 50 μ L, différentes dilutions de NADL-2 comme matrice et les amorces extérieures seules, aucune des enzymes ne s'est réellement démarquée. Par souci d'uniformité et d'économie, l'enzyme de Bio/Can fut conservée pour tout le projet de recherche.

L'addition de cosolvants à la réaction de PCR étant régulièrement citée dans la littérature (revue dans PCR: Clinical Diagnostics and Research, 1992), différents ajouts ont été comparés au tampon PCR de base: DMSO à 5%, formamide à 5%, Tween-20 à 1%, glycérol à 10% et spermidine 1 mM (Wan et Wilkins, 1993). Certains ont aussi été testés en combinaison: formamide + Tween-20, formamide + glycérol, Tween-20 + glycérol et finalement, formamide + Tween-20 + glycérol. Règle générale, trois dilutions de NADL-2 (10^8 , 10^6 , 10^4 molécules) servaient de matrice aux amorces extérieures pr6 et pr10. Chaque réaction de 50 μ L contenait 1 U seulement de *Taq*, afin de ne pas masquer l'amélioration possible due au cosolvant. De tous ces essais, seule l'addition de Tween-20 a clairement augmenté l'efficacité de la PCR. Aussi, pour la suite de la recherche, le tampon "maison" #1 a-t-il été modifié de façon à contenir une concentration finale en Tween-20 de 1%.

Enfin, l'utilisation de tubes à parois minces pour PCR ("Thin Walls" de Cetus) a été envisagée. Dans un test comparatif employant plusieurs dilutions de NADL-2

comme ADN cible, en conjonction avec les amorces extérieures et 1 U de *Taq*/réaction, ces derniers ont présenté une qualité d'amplification inférieure à celle des tubes conventionnels. Leur emploi a donc été discontinué.

1.5 "*Modus operandi*"

La majorité des tests effectués à ce stade ont eu recours à l'utilisation d'un départ à chaud ("hot start") employant une barrière de paraffine, plutôt que l'assemblage complet des réactifs à la température ambiante (voir Résultats, 1.1); ceci dans le but de réduire la formation de dimères d'amorces et d'augmenter l'efficacité des premiers cycles d'amplification (Mullis, 1991; D'Aquila *et al.*, 1991). De plus, cette façon de faire allait dans le sens de certains auteurs préconisant une forte dénaturation de l'ADN cible (Vandenvelde *et al.*, 1990).

Afin de s'assurer de ces prémisses et d'optimiser la PCR différentielle, différents modes opératoires utilisant la barrière de paraffine ont été essayés. Dans la plupart des cas, une série de dilutions de NADL-2 (5×10^8 à 5×10^3 molécules) servait d'ADN cible aux amorces extérieures pr6 et pr10. Le tout était amplifié dans le tampon #1 additionné de 1 U de *Taq* par réaction de 50 μ L. Hormis les deux premiers essais, une manipulation parallèle, où tous les réactifs étaient réunis à la température de la pièce et recouverts d'huile minérale, accompagnait le test.

Une première tentative regroupait l'ADN et les dNTP dans le cocktail inférieur. Les tubes étaient incubés 30 min à 99°C, puis maintenus à 80°C pour l'ajout du cocktail supérieur contenant l'enzyme et les amorces. L'amplification ayant totalement échoué, le test fut répété en incubant la portion inférieure 5 min à 96°C, avant de la maintenir à 80°C pour l'ajout de la portion supérieure. Sans être nulle, l'amplification fut tout de même très erratique. Les essais suivants ont été effectués en maintenant le cocktail inférieur 5 min à 96°C, puis en le déposant sur glace le temps d'ajouter le cocktail supérieur. L'amplification fut nettement mieux réussie, quoique la manipulation parallèle (température ambiante + huile) était sensiblement supérieure.

Une deuxième série d'essais modifia légèrement la stratégie. Le tampon d'amplification fut divisé en deux parties: une contenant tous les ingrédients, sauf le KCl; l'autre contenant tous les ingrédients, sauf le MgCl₂. La première était dédiée au cocktail inférieur contenant l'ADN et les dNTP, alors que la deuxième s'adressait au cocktail supérieur devant contenir la *Taq* et les amorces. La portion inférieure était incubée 5 min à 80°C, puis ramenée à la température de la pièce afin de solidifier la paraffine. La portion supérieure était alors ajoutée et les tubes positionnés dans le thermocycleur chaud (>72°C). Contrairement aux tests précédents, le premier cycle de PCR comportait une dénaturation de 1:30 min à 96°C, alors que les cycles subséquents dénaturaient la cible 1 min à 94°C. Cette façon de faire produisit la meilleure qualité d'amplification et était régulièrement supérieure à la manipulation parallèle où tous les

réactifs étaient assemblés à température ambiante et recouverts d'huile minérale. D'utilisation commode, cette procédure de départ à chaud fut conservée pour la suite du projet de recherche.

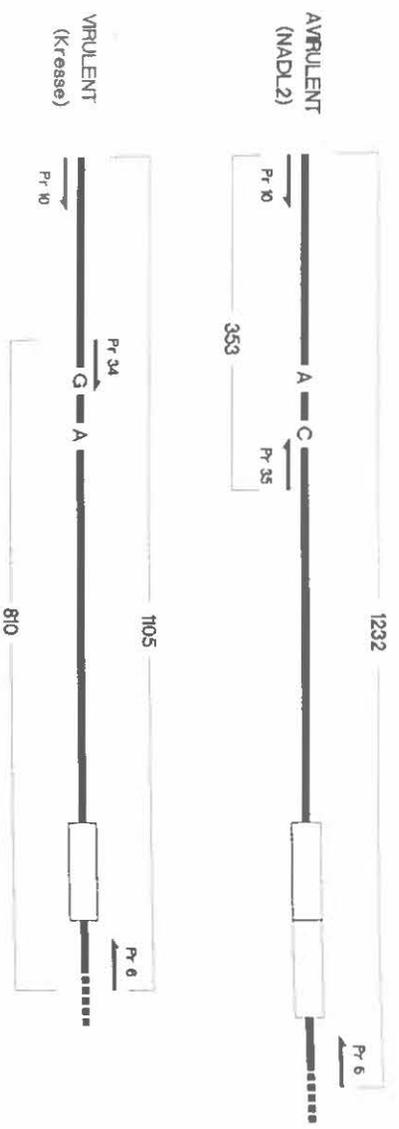
1.6 En résumé

La mise au point de la PCR différentielle discriminant les constructions de laboratoire P17 (NADL-2) et K5R12 (Kresse) a permis d'établir les conditions suivantes: les amorces équimolaires pr6, pr10, pr34 et pr35(1) étaient hybridées à une température de 45°C; le tampon d'amplification "maison" reprenait la composition du tampon Bio/Can, mais utilisait un Tris-HCl à pH 8,5 et était additionné de 1% de Tween-20; ce tampon se subdivisait en version "haute" contenant le KCl, et en version "basse" contenant le MgCl₂; 2 U de *Taq* Bio/Can accompagnaient une réaction de 50 µL; et finalement, une procédure de départ à chaud utilisant une barrière de paraffine complétait l'ensemble (Figure 8). Ces conditions d'opération ont servi de bases à l'étude de stabilité de l'ADN, au diagnostic d'échantillons cliniques et au développement de la PCR quantitative. Naturellement, des modifications ont été introduites pour répondre aux besoins spécifiques de chacun de ces aspects.

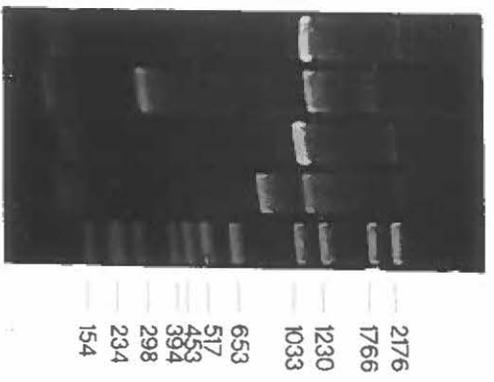
Figure 8

Résultats obtenus par PCR différentielle, en utilisant les conditions résumées au point 1.6. Sur la photo de gauche, 10 μ L de chacun des produits de PCR et 3 μ L de marqueur de poids moléculaire (marqueur VI, de Boehringer Mannheim) ont été chargés sur gel d'agarose à 1%. Après électrophorèse dans du tampon TBE (1 h à 100 V), le gel a été coloré au bromure d'éthidium et photographié sous UV. Les cocktails à 2 amorces contenaient uniquement les amorces extérieures pr6 et pr10, alors que ceux à 4 amorces étaient additionnés des amorces intérieures discriminantes pr34 et pr35.

La photo de droite a été obtenue lors de conditions opératoires identiques, en utilisant uniquement des cocktails à 4 amorces. Les premier et dernier puits contenait 2 μ L de marqueur VI. Les clones 11 et 22 ont été produits par mutagenèse dirigée (Mat. et Méth., 4.1.1) et correspondaient au génome NADL-2 muté de telle sorte que le site naturel *EcoRI* soit transformé en site de restriction *BamHI*. Tel que prévu, cette modification ne devait pas avoir d'impact en PCR différentielle et les deux clones conservaient leur profil avirulent. Les puits 1 à 9 représentaient différentes tentatives de mutagenèse où le fragment *BglII* du génome viral, contenant le déterminant allotropique (Bergeron *et al.*, 1996; Figure 1), était transféré d'une souche à l'autre (NADL-2, Kresse et *vice versa*). Comme on peut le voir par PCR différentielle, les échantillons 6 et 8 correspondaient à une matrice NADL-2, alors que 4, 5 et 9 étaient de type Kresse. Par contre, les constructions 1 et 3 représentaient un "background" avirulent (1232 pb) contenant un insert de type virulent (810 pb + 127 pb dues au "background"). À l'opposé, la construction 7 représentait un "background" virulent (1105 pb) contenant un insert de type avirulent (353 pb). Dans le cas du spécimen 2, l'insert était de type avirulent, mais l'information quant au "background" était manquante. L'ensemble de ce test confirmait que la PCR différentielle pouvait non seulement identifier les souches "classiques", mais aussi des éventuels réarrangements génomiques survenant dans le champ.



NADL2 2 amorces
 NADL2 4 amorces
 Kresse 2 amorces
 Kresse 4 amorces
 M



M
 NADL2
 Kresse
 clone #11
 clone #22
 1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 M



2. ÉTUDE DE STABILITÉ DE L'ADN

La mise au point de la PCR différentielle a nécessité quelques centaines de réactions individuelles utilisant différentes préparations, dilutions et conservations d'ADN cible. Une chose se dégageait clairement de cet exercice: l'efficacité de la réaction variait grandement entre les analyses, tout comme à l'intérieur d'un même test. Quelquefois, pour des raisons obscures, une réaction normalement positive ne fonctionnait plus du tout. Nonobstant les paramètres étudiés dans un essai donné, certaines variables influençaient donc les résultats attendus et échappaient au contrôle.

En terme de diagnostic, cette situation était inacceptable. Aussi, afin de cerner le problème et d'évaluer l'impact possible de la préparation et de la conservation de l'ADN cible, l'étude de stabilité a été entreprise aux conditions décrites précédemment dans Matériel et Méthodes, section 3.

2.1 Résultats obtenus

Premièrement, que l'acide nucléique ait été obtenu par lyse alcaline "classique", ou à l'aide des trousse commerciales de Qiagen ou Promega, n'avait pas d'influence déterminante sur les résultats (Tableau 5). Chacune des préparations a présenté des "trous" (absence inattendue de produit de PCR) et des incohérences (produit de PCR

plus faible qu'attendu). Règle générale, ces disparités se retrouvaient surtout aux dilutions élevées d'ADN cible dénotant ainsi la limite d'efficacité du système choisi. Par contre, le phénomène était aussi rencontré de façon sporadique un peu partout dans l'étude. Fait intéressant, certaines dilutions données ont systématiquement mal réagi tout au long de cette recherche: par exemple, la dilution 2 de l'ADN extrait par lyse "classique" et conservé à 4°C, et plus particulièrement la dilution 4 de l'ADN purifié avec la trousse Promega. Cette dernière, conservée à 4°C, a présenté un mauvais rendement; alors que les versions conservées à -20°C ont été carrément déficientes dans la série gel/dégel ou excellentes dans les séries à usage unique. Pourtant, chacune de ces versions provenait d'une solution-mère commune, laquelle avait aussi servi à composer la dilution 5 subséquente.

Au niveau de la stabilité comme telle, peu de différences marquantes ont été observées entre l'entreposage à 4°C et la série gel/dégel conservée à -20°C. Cette dernière a quand même paru souffrir un peu plus des cycles de gel et de dégel. Par contre, dans les deux cas, la qualité de l'ADN semble s'être nettement détériorée entre les jours 60 et 120; et uniquement les concentrations les plus élevées ont résisté au vieillissement. Enfin, les séries conservées à -20°C et destinées à un usage unique se sont globalement bien comportées aux jours 24, 37 et 58.

Tableau 5
Étude de stabilité de l'ADN

Dil.	Lyse "classique"									Qiagen									Promega								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Jour	ADN conservé à 4°C																										
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ADN conservé à -20°C (série gel/dégel)																										
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	ADN conservé à -20°C (3 séries à usage unique)																										
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

- + : produit de PCR attendu
 gris pâle : produit de PCR plus faible qu'attendu
 gris moyen : produit de PCR beaucoup plus faible qu'attendu
 gris foncé : absence de produit de PCR
 * : vieillissement accéléré ... série gelée et dégelée 20 fois au total

Des différences de rendement général ont aussi été notées lors de tests particuliers. Ainsi, au jour 10, la PCR effectuée sur les préparations conservées à 4°C a été nettement moins réussie que les essais ultérieurs utilisant les mêmes matrices. Le tampon "maison" fabriqué ce jour-là contenait du Tween-20 contaminé de moisissures. Un nouveau stock de tampon d'amplification a été composé à partir de solutions fraîches et aliquoté à -20°C, ce qui a résolu le problème. À l'opposé, au jour 60, l'ensemble des résultats obtenus avec la série gel/dégel fut supérieur à la moyenne et correspondait à la première utilisation d'un nouveau lot de polymérase *Taq*.

2.2 Présence d'inhibiteurs

La dilution 4 ($1,6 \times 10^6$ molécules par 5 μ L) de l'ADN purifié avec la trousse de Promega représentait un bel exemple de "trous" et d'incohérences rencontrés en PCR. Déjà, au jour 19, les données accumulées avec les séries conservées à 4°C et à -20°C (gel/dégel) indiquaient la présence d'un problème particulier. Afin de vérifier la tendance, une ronde de PCR a été effectuée au jour 20 sur 10 aliquotes de 5 μ L de chacune des deux dilutions. De plus, 10 autres aliquotes de la dilution congelée ont été amplifiées à l'aide des amorces pr10 et pr35(1) générant le petit fragment de 353 pb, typique à la matrice NADL-2. Les résultats obtenus (Tableau 6) confirmèrent la tendance: la dilution conservée à 4°C fonctionnait de façon erratique, alors que celle conservée à -20°C échouait systématiquement l'amplification d'un fragment de 1232 pb.

Tableau 6

Présence d'inhibiteurs: étude de la dilution 4 de Promega

Rendement en PCR : test au jour 20										
10 aliquotes de la série conservée à 4°C	+	+	+	+	↓	↓	↓	↓	↓	0
10 aliquotes de la série gel/dégel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Idem, mais amplification de 353 pb*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0

Précipitation et resolubilisation dans le volume initial										
Assemblage de séries à usage unique	+	+	+	+	+	+	+	↓	↓	0
10 aliquotes de la série gel/dégel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Transport d'inhibiteur (série gel/dégel)												
5 aliquotes de la dilution 3								+	+	+	↓	↓
5 aliquotes du mélange des dilutions 3 et 4 (1:1)								+	+	+	0	0
5 aliquotes de la dilution 4								0	0	0	0	0
5 aliquotes du mélange des dilutions 4 et 5 (1:1)								+	↓	0	0	0
5 aliquotes de la dilution 5								+	+	+	↓	0
4 aliquotes de la dilution 5 (2,5 µL au lieu des 5 µL usuels)								+	+	+	+	↓

* Tous les autres résultats réfèrent à un produit de PCR de 1232 pb

+ Produit de PCR attendu

↓ Produit de PCR plus faible qu'attendu

↓↓ Produit de PCR beaucoup plus faible qu'attendu

0 Absence de produit de PCR

Même un amplicon de 353 pb, couramment très facile à produire, ne parvenait que très difficilement à être généré.

Deux hypothèses furent envisagées: des agrégats d'acide nucléique faussaient "l'aliqotage" ou encore, un inhibiteur quelconque nuisait à la réaction. Pour vérifier la première théorie, 50 μ L de la dilution 4, série gel/dégel, ont été précipités et resuspendus dans le volume initial (Mat. et Méth., 3.3). À titre de contrôle, un assemblage de 50 μ l de la même dilution, mais destinée à un usage unique, a été traité de façon identique. Des tests préliminaires indiquaient que les dilutions 4 à usage unique de Promega fonctionnaient bien. Immédiatement après la resolubilisation des ADN, la PCR a été effectuée sur 10 aliquotes de 5 μ l de chacune des préparations. Les résultats demeurèrent inchangés: la dilution 4 de la série gel/dégel était strictement incapable de générer l'amplification attendue (Tableau 6 et Figure 9).

Comme l'agrégation de l'ADN ne semblait pas être en cause, la présence possible d'un inhibiteur de PCR a été vérifiée par transport du problème dans les dilutions adjacentes à la dilution 4 de la série gel/dégel. Jusqu'à présent, ces dernières répondaient bien en PCR. Les dilutions 3, 4 et 5 ont été testées individuellement et en combinaison de volumes égaux (3+4, 4+5 et 5+H₂O). Les résultats obtenus (Tableau 6 et Figure 9) semblaient bien indiquer que la dilution 4, seule et en combinaison, nuisait à l'efficacité de l'amplification, les "trous" en PCR étant presque exclusivement reliés à sa présence.

2. ÉTUDE DE STABILITÉ DE L'ADN

La mise au point de la PCR différentielle a nécessité quelques centaines de réactions individuelles utilisant différentes préparations, dilutions et conservations d'ADN cible. Une chose se dégageait clairement de cet exercice: l'efficacité de la réaction variait grandement entre les analyses, tout comme à l'intérieur d'un même test. Quelquefois, pour des raisons obscures, une réaction normalement positive ne fonctionnait plus du tout. Nonobstant les paramètres étudiés dans un essai donné, certaines variables influençaient donc les résultats attendus et échappaient au contrôle.

En terme de diagnostic, cette situation était inacceptable. Aussi, afin de cerner le problème et d'évaluer l'impact possible de la préparation et de la conservation de l'ADN cible, l'étude de stabilité a été entreprise aux conditions décrites précédemment dans Matériel et Méthodes, section 3.

2.1 Résultats obtenus

Premièrement, que l'acide nucléique ait été obtenu par lyse alcaline "classique", ou à l'aide des trousse commerciales de Qiagen ou Promega, n'avait pas d'influence déterminante sur les résultats (Tableau 5). Chacune des préparations a présenté des "trous" (absence inattendue de produit de PCR) et des incohérences (produit de PCR

plus faible qu'attendu). Règle générale, ces disparités se retrouvaient surtout aux dilutions élevées d'ADN cible dénotant ainsi la limite d'efficacité du système choisi. Par contre, le phénomène était aussi rencontré de façon sporadique un peu partout dans l'étude. Fait intéressant, certaines dilutions données ont systématiquement mal réagi tout au long de cette recherche: par exemple, la dilution 2 de l'ADN extrait par lyse "classique" et conservé à 4°C, et plus particulièrement la dilution 4 de l'ADN purifié avec la trousse Promega. Cette dernière, conservée à 4°C, a présenté un mauvais rendement; alors que les versions conservées à -20°C ont été carrément déficientes dans la série gel/dégel ou excellentes dans les séries à usage unique. Pourtant, chacune de ces versions provenait d'une solution-mère commune, laquelle avait aussi servi à composer la dilution 5 subséquente.

Au niveau de la stabilité comme telle, peu de différences marquantes ont été observées entre l'entreposage à 4°C et la série gel/dégel conservée à -20°C. Cette dernière a quand même paru souffrir un peu plus des cycles de gel et de dégel. Par contre, dans les deux cas, la qualité de l'ADN semble s'être nettement détériorée entre les jours 60 et 120; et uniquement les concentrations les plus élevées ont résisté au vieillissement. Enfin, les séries conservées à -20°C et destinées à un usage unique se sont globalement bien comportées aux jours 24, 37 et 58.

Tableau 5

Étude de stabilité de l'ADN

Dil.	Lyse "classique"									Qiagen									Promega								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Jour	ADN conservé à 4°C																										
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ADN conservé à -20°C (série gel/dégel)																										
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	ADN conservé à -20°C (3 séries à usage unique)																										
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

- + : produit de PCR attendu
 gris pâle : produit de PCR plus faible qu'attendu
 gris moyen : produit de PCR beaucoup plus faible qu'attendu
 gris foncé : absence de produit de PCR
 * : vieillissement accéléré ... série gelée et dégelée 20 fois au total

Des différences de rendement général ont aussi été notées lors de tests particuliers. Ainsi, au jour 10, la PCR effectuée sur les préparations conservées à 4°C a été nettement moins réussie que les essais ultérieurs utilisant les mêmes matrices. Le tampon "maison" fabriqué ce jour-là contenait du Tween-20 contaminé de moisissures. Un nouveau stock de tampon d'amplification a été composé à partir de solutions fraîches et aliquoté à -20°C, ce qui a résolu le problème. À l'opposé, au jour 60, l'ensemble des résultats obtenus avec la série gel/dégel fut supérieur à la moyenne et correspondait à la première utilisation d'un nouveau lot de polymérase *Taq*.

2.2 Présence d'inhibiteurs

La dilution 4 ($1,6 \times 10^6$ molécules par 5 μ L) de l'ADN purifié avec la trousse de Promega représentait un bel exemple de "trous" et d'incohérences rencontrés en PCR. Déjà, au jour 19, les données accumulées avec les séries conservées à 4°C et à -20°C (gel/dégel) indiquaient la présence d'un problème particulier. Afin de vérifier la tendance, une ronde de PCR a été effectuée au jour 20 sur 10 aliquotes de 5 μ L de chacune des deux dilutions. De plus, 10 autres aliquotes de la dilution congelée ont été amplifiées à l'aide des amorces pr10 et pr35(1) générant le petit fragment de 353 pb, typique à la matrice NADL-2. Les résultats obtenus (Tableau 6) confirmèrent la tendance: la dilution conservée à 4°C fonctionnait de façon erratique, alors que celle conservée à -20°C échouait systématiquement l'amplification d'un fragment de 1232 pb.

Tableau 6

Présence d'inhibiteurs: étude de la dilution 4 de Promega

Rendement en PCR : test au jour 20										
10 aliquotes de la série conservée à 4°C	+	+	+	+	↓	↓	↓	↓	↓	0
10 aliquotes de la série gel/dégel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Idem, mais amplification de 353 pb*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0

Précipitation et resolubilisation dans le volume initial										
Assemblage de séries à usage unique	+	+	+	+	+	+	+	↓	↓	0
10 aliquotes de la série gel/dégel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Transport d'inhibiteur (série gel/dégel)										
5 aliquotes de la dilution 3								+	+	↓
5 aliquotes du mélange des dilutions 3 et 4 (1:1)								+	+	0
5 aliquotes de la dilution 4								0	0	0
5 aliquotes du mélange des dilutions 4 et 5 (1:1)								+	↓	0
5 aliquotes de la dilution 5								+	+	↓
4 aliquotes de la dilution 5 (2,5 µL au lieu des 5 µL usuels)								+	+	↓

* Tous les autres résultats réfèrent à un produit de PCR de 1232 pb

+ Produit de PCR attendu

↓ Produit de PCR plus faible qu'attendu

↓↓ Produit de PCR beaucoup plus faible qu'attendu

0 Absence de produit de PCR

Même un amplicon de 353 pb, couramment très facile à produire, ne parvenait que très difficilement à être généré.

Deux hypothèses furent envisagées: des agrégats d'acide nucléique faussaient "l'aliquotage" ou encore, un inhibiteur quelconque nuisait à la réaction. Pour vérifier la première théorie, 50 μ L de la dilution 4, série gel/dégel, ont été précipités et resuspendus dans le volume initial (Mat. et Méth., 3.3). À titre de contrôle, un assemblage de 50 μ l de la même dilution, mais destinée à un usage unique, a été traité de façon identique. Des tests préliminaires indiquaient que les dilutions 4 à usage unique de Promega fonctionnaient bien. Immédiatement après la resolubilisation des ADN, la PCR a été effectuée sur 10 aliquotes de 5 μ l de chacune des préparations. Les résultats demeurèrent inchangés: la dilution 4 de la série gel/dégel était strictement incapable de générer l'amplification attendue (Tableau 6 et Figure 9).

Comme l'agrégation de l'ADN ne semblait pas être en cause, la présence possible d'un inhibiteur de PCR a été vérifiée par transport du problème dans les dilutions adjacentes à la dilution 4 de la série gel/dégel. Jusqu'à présent, ces dernières répondaient bien en PCR. Les dilutions 3, 4 et 5 ont été testées individuellement et en combinaison de volumes égaux (3+4, 4+5 et 5+H₂O). Les résultats obtenus (Tableau 6 et Figure 9) semblaient bien indiquer que la dilution 4, seule et en combinaison, nuisait à l'efficacité de l'amplification, les "trous" en PCR étant presque exclusivement reliés à sa présence.

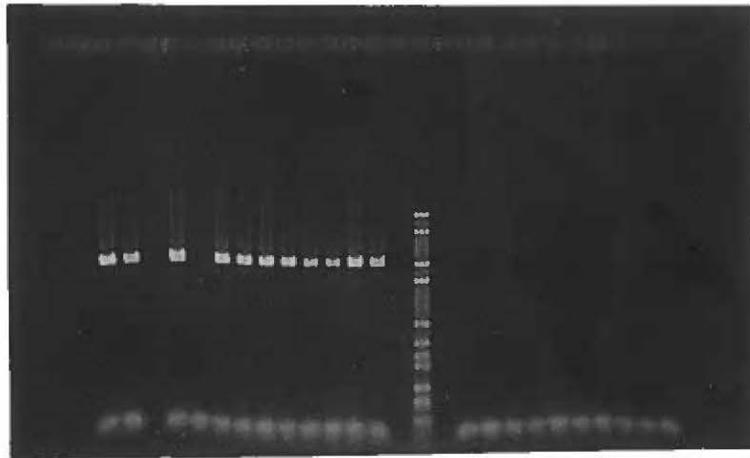
Figure 9

Les "trous" en PCR. Sur la photo de gauche, l'agrégation possible de l'ADN a été vérifiée par précipitation et resolubilisation de la matrice. Les deux premiers puits correspondent à deux aliquotes des dilutions 4 de Promega (à usage unique) ayant servi à l'assemblage requis pour les 10 précipitations adjacentes. Dans l'ensemble, avant comme après précipitation, la dilution 4 destinée à un usage unique fonctionnait bien. Sur les dix résultats de précipitation, 7 présentaient le produit de PCR attendu, 2 étaient un peu plus faibles et un seul était absent. Ceci était assez typique d'un test de PCR effectué sur plusieurs aliquotes d'une solution-mère donnée. À l'opposé, les 10 aliquotes de la dilution 4 conservée à -20°C (gel/dégel), précipitée et resolubilisée de façon identique, n'ont généré aucun produit de PCR. L'absence de réponse ne semblait donc pas provenir d'une agrégation de l'ADN.

La photo de droite résume la stratégie employée afin de cerner la présence possible d'un inhibiteur. Comme on le voit, les dilutions 3 et 5 (de même que la dilution 5 coupée avec un volume égal d'eau) répondaient globalement bien. Par contre, la dilution 4, ou l'ajout de dilution 4 aux solutions précédentes, se traduisaient par une absence répétée de produit de PCR. Il était donc possible de transporter le problème parallèlement à la dilution fautive.

Proméga ④
série "usage unique"
2 contrôles
10 précipitations

Proméga ④
série -20°C
10 précipitations

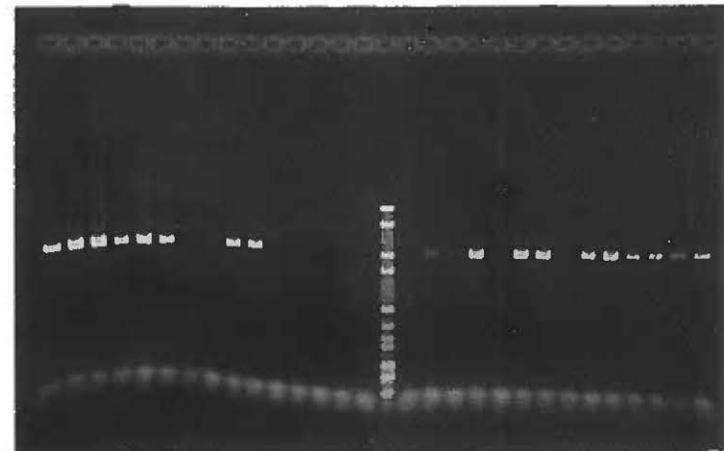


Agrégats d'ADN ?

➔ Précipitation

Dilutions ③, ④ et ⑤
Proméga, série -20°C

③ ③+④ ④ ④+⑤ ⑤ ⑤+H₂O



Inhibiteurs de PCR ?

➔ Transport dans un autre tube

3. PCR QUANTITATIVE

D'un strict point de vue de contrôle de qualité, et après plus d'un millier de réactions de PCR découlant de la mise au point de la PCR différentielle et de l'étude de stabilité de l'ADN, les données recueillies allaient dans le même sens. On notait des variations d'efficacité significatives inter et intra-analyses. À la limite, des positifs forts (e.g 1,6 million de copies dans 5 μ L de la dilution 4) pouvaient carrément ne pas être amplifiés. La performance globale de la PCR était fortement tributaire de la qualité des réactifs employés, et des substances inhibitrices non identifiées pouvaient anéantir la réaction. Autant de considérations qui exigeaient un encadrement de la PCR avant d'envisager son utilisation à des fins diagnostiques.

3.1 *Standard interne*

3.1.1 *Mutagenèse dirigée*

Suite à la deuxième tentative de mutagenèse dirigée, décrite à la section 4.1.1 de Matériel et Méthodes, 22 clones choisis au hasard ont été criblés par digestion enzymatique avec *Bam*HI. Cinq d'entre eux ont présenté, après électrophorèse sur gel d'agarose, les deux bandes attribuables au site présent dans la région de clonage multiple du vecteur, auquel s'ajoutait le nouveau site provenant de la transformation de *Eco*RI du PPV. Les autres étaient seulement linéarisés.

Comme vérification supplémentaire, les transformants ont été soumis à la digestion de *XmnI* et de *EcoRI*. Tel que prévu, ceux-ci n'ont pas été affectés par la première restriction, ceci démontrant que le site unique du vecteur avait aussi été aboli par mutagenèse. La deuxième digestion n'a fait que linéariser les plasmides, suggérant que le site *EcoRI* naturellement présent dans le PPV avait été transformé et que seul demeurait celui appartenant au vecteur.

La vérification définitive de deux transformants (clones #11 et #22) et du plasmide P17 (NADL-2) comme contrôle a été effectuée par le Service de séquençage de l'IAF. Les trois séquences nucléotidiques étaient identiques, sauf la région correspondant à la position 3590 (Bergeron *et al.*, 1993) qui présentait le site GAATTC transformé en GGATCC (Figure 10).

3.1.2 Transfections de cellules porcines

À l'aide du génome muté et théoriquement infectieux du plasmide-PPV, plusieurs essais de transfections de cellules porcines ont été entrepris dans le but de produire un parvovirus mutant, pouvant servir de véritable contrôle interne lors de toutes les étapes de la PCR quantitative, de l'extraction de l'échantillon clinique à l'amplification comme telle. Alors que les contrôles accompagnant chacune des manipulations ont donné les résultats escomptés, toutes les tentatives avec les clones 11 et 22 ont échoué. Ainsi, les

Figure 10

Vérification par séquençage des transformants 11 et 22. La photographie représente la portion du gel de séquence couvrant la région du site *EcoRI*, présent naturellement chez le PPV. Au niveau de la flèche, on retrouve la suite GAATTC de NADL-2 transformée en GGATCC (*Bam*HI) chez les clones #11 et #22. Mise à part cette différence, les trois séquences étaient identiques.



témoins-cellules PT et PFT se sont multipliés sans trace de contamination; les infections au PPV ont toutes produit un ECP total en quelques jours; et les transfections utilisant l'ADN plasmidique de P17 ont généré du virus à chaque passage (Tableau 7).

Aucune détection de présence virale, par ECP et HA, n'a pu être associée aux transfections à base d'ADN muté. Seule la PCR⁸ a révélé des traces de génome viral lors du premier passage sur cellules PFT. Devant l'impossibilité de produire du virus mutant, les constructions plasmidiques 11 et 22 ont donc servi de standard interne lors des tests ultérieurs de PCR quantitative.

3.2 PCR compétitive

3.2.1 Résultats préliminaires

Tel que décrit précédemment (Mat. et Méth., 4.2.1), la PCR compétitive reprenait les conditions d'opération établies lors de la PCR différentielle. Les amorces utilisées (pr-39b et pr-43) généraient un produit biotinylé de 397 pb, la température d'hybridation était fixée à 55°C, et la réaction se déroulait sur 30 cycles d'amplification.

⁸ Conditions d'amplification utilisées en PCR quantitative et générant un fragment de 397 pb. Les flacons étaient gelés et dégelés 3X et 100 µL de surnageant clarifié étaient additionnés de 900 µL de tampon de PCR contenant 500 µg de protéinase K. Après une nuit d'incubation à 37°C, l'enzyme était inactivée et 5 µL de la préparation servaient à l'amplification.

Tableau 7

Transfections de cellules porcines

Cellules	ADN	ECP	HA	PCR
PT Deuxième passage	Témoin cell.	Négatif	Négatif	Négatif
	P17	100%	128	Positif fort
	Mutant #11	Négatif	Négatif	Négatif
	Mutant #22	Négatif	Négatif	Négatif
PFT* Premier passage divisé en 2, deux jours postinfection	Témoin cell.	Négatif	Négatif	Négatif
	P17 (1)	95%	512	Positif fort
	P17 (2)	50%	32	Positif fort
	Mutant #11 (1)	Cellules granuleuses, mais pas d'ECP évident	Négatif	Positif faible
	Mutant #11 (2)		Négatif	Positif faible
	Mutant #22 (1)		Négatif	Positif faible
	Mutant #22 (2)		Négatif	Positif faible
PFT** Deuxième passage: adsorption de 1 ml du 1 ^{er} passage sur feuille de cellules confluentes	P17 (a)	70%	256	Positif fort
	P17 (b)	70%	256	Positif fort
	Mutant #11 (a)	Cellules granuleuses, mais pas d'ECP évident	Négatif	Négatif
	Mutant #11 (b)		Négatif	Négatif
	Mutant #11 (c)		Négatif	Négatif
	Mutant #22 (a)		Négatif	Négatif
	Mutant #22 (b)		Négatif	Négatif
Mutant #22 (c)	Négatif		Négatif	

* Le flacon (1) correspond au flacon original réutilisé, alors que le (2) est neuf.

** Les flacons (a), (b) et (c) sont identiques et contiennent chacun un feuillet cellulaire confluent.

Des tests préliminaires furent effectués en utilisant des quantités égales (10^7 molécules par réaction de 50 μ L) de P17, K5R12, mutant #11, mutant #22 et des combinaisons 1:1 de chacun des ADN. Toutes les matrices ont largement produit le fragment attendu, et ce avec une intensité comparable sur gel d'agarose. Les digestions enzymatiques subséquentes démontrèrent que les amplicons de P17 et K5R12 étaient coupés par *EcoRI*, sans être affectés par *BamHI*; alors que l'inverse était vrai pour les clones 11 et 22. Par contre, les mélanges 1:1 d'ADN de type NADL-2 ou Kresse avec l'ADN muté présentaient un profil différent: environ 1/3 du produit de PCR résistait à la coupure simultanée des deux enzymes. Ceci laissait donc supposer la formation d'hétéroduplex, hybrides d'ADN sauvage et mutant, en cours de PCR.

Afin d'identifier le minimum détectable sur gel d'agarose, un assemblage d'ADN plasmidique extrait des clones #11 et #22 a été dilué dans du TE, de 10^6 à 10^1 molécules par 5 μ L, et testé aux conditions de PCR précitées. Le même exercice a été effectué en utilisant comme diluant un extrait de fœtus porcin négatif au PPV; ceci dans le but de simuler les conditions ultérieures de PCR compétitive sur des échantillons cliniques. Avec 10^3 molécules de départ, le standard interne dilué dans l'extrait porcin générait un produit de PCR suffisamment concentré pour que 10 μ L produisent un signal faible, mais clair, sur gel d'agarose. Avec 10^2 molécules, des traces étaient encore perceptibles sur gel. Le système était légèrement moins efficace lorsque le standard était dilué dans du TE, fort probablement parce que l'extrait porcin était en suspension dans du tampon

d'amplification (cet aspect sera abordé un peu plus loin). Il fut donc décidé de considérer l'ajout de 500 molécules de standard interne dans les tests futurs de PCR quantitative sur les échantillons cliniques.

3.2.2 Problèmes de contamination

Nous avons éprouvé, à cette étape de la recherche, de très sérieux problèmes de contamination au cours des tests de PCR. Malgré l'utilisation systématique d'embouts de pipettes ouatés (Aerosol Resistant Tips), les contrôles négatifs ne contenant pas d'ADN réussissaient à amplifier le fragment de 397 pb. Après digestion du produit de PCR, il apparaissait que la contamination provenait d'ADN de type muté (coupure par *Bam*HI). Le fait d'avoir procédé aux manipulations de mutagenèse et de transfections avec les mêmes pipettes et dans les mêmes aires de travail que celles utilisées pour la PCR a sans nul doute été la cause de ces ennuis.

Afin de redresser la situation, toutes les solutions "maison" ont été refaites, de nouvelles amorces ont été synthétisées, et les réactifs non remplacés ont été vérifiés par PCR dans un autre laboratoire, à l'aide de pipettes différentes. Les pipettes originales ont été traitées aux UV et à l'hypochlorite de sodium à 10% (procédures de décontamination revues dans PCR: Clinical Diagnostics and Research, 1992). Malgré tout, des traces de contamination apparaissaient sporadiquement lors d'amplifications

de 35 cycles. En maintenant la PCR quantitative à 30 cycles, et en utilisant des pratiques rigoureuses de travail, la situation s'est finalement normalisée.

3.3 Système de détection de format ELISA

3.3.1 Conditions d'opération

Tout d'abord, deux plateaux de type "high binding" (Dynatech et Nunc) furent évalués quant à leur capacité d'enrobage d'avidine et de streptavidine, en solution dans des tampons carbonate⁹ ou PBS. Les deux plateaux présentèrent des résultats équivalents, mais les modules U16 de Nunc furent préférés à cause de la plus grande versatilité d'utilisation offerte par les barrettes amovibles. Les enrobages d'avidine en tampons carbonate ou PBS furent éliminés à cause du bruit de fond élevé et du manque de spécificité: des produits de PCR non biotinylés réagissant presque aussi fortement que des produits biotinylés. Par contre, l'enrobage de streptavidine en tampon PBS produisit le meilleur niveau d'absorbance, tout en discriminant les produits non biotinylés. Le bruit de fond ("blancs" ne contenant pas d'ADN) était inférieur à 0,100. Différentes concentrations de streptavidine furent essayées: de 500 à 20 000 fmoles par cupule. Un enrobage de 5 000 fmoles (300 ng) représentait le meilleur compromis en termes d'économie, d'intensité et de linéarité de réponse. Au-delà de ce cap, le niveau

⁹Tampon carbonate 0,05 M à pH 9,6: Na₂CO₃ 0,015 M + NaHCO₃ 0,035 M dans H₂O.

général des absorbances n'augmentait que légèrement. Ces tests préliminaires ont été établis *versus* quelques μL de produits de PCR biotinylés et ont permis de définir une "fenêtre" d'opération (Figure 11).

À première vue, la détection semblait linéaire pour 5 à 75 fmoles de produit de PCR (équivalent de 1 à 20 ng d'un fragment de 397 pb), avec un seuil de détectabilité d'environ 1 fmoles. Ceci laissait présager que, pour un produit de PCR d'intensité moyenne, 1 μL de la réaction serait adéquat pour la détection par ELISA. Pour un produit jugé plus concentré sur gel d'agarose, une fraction de μL était suffisante. Dans le cas d'un produit de PCR invisible sur gel (e.g. $<1 \text{ ng}/\mu\text{L}$), l'aliquote utilisée en ELISA pouvait être augmentée. Des tests en ce sens ont montré qu'entre 3 et 6 μL , dépendant de la fraîcheur de l'enrobage à la streptavidine, pouvaient être utilisés lorsque l'amorce biotinylée se retrouvait à 0,5 μM dans le cocktail d'amplification. Au-delà de ces limites, la réponse de l'échantillon plafonnait.

Dans la majorité des tests ELISA, 100 fmoles de sonde furent employées. Cette quantité pouvait être augmentée dans le but de ne pas limiter la détection de produits de PCR concentrés, mais c'était alors les limitations du spectrophotomètre qui prenaient place. En effet, le fait d'accroître la concentration de sonde à 250 et 500 fmoles par cupule augmentait proportionnellement les absorbances, mais ne repoussait pas la plage linéaire de détection inhérente à l'appareil (maximum: $\approx 2,5 \text{ DO}$). Les températures

Figure 11**Courbe d'absorbance PCR-ELISA**

Plateau Maxisorp Immuno Module U16 de Nunc (cat. #4-64394).

Enrobage de 5 000 fmoles (300 ng) de streptavidine dans 100 μ L de PBS / cupule.

Incubation à 4°C, pendant la nuit; suivie d'un lavage au PBS-Tween à 0,05% (PBST).

Blocage avec 300 μ L de PBST + 1% de BSA, 1 h à 37°C; suivi d'un lavage au PBST.

Produit de PCR biotinylé de 353 pb (généralisé à l'aide de pr-10b et pr35(1) en PCR différentielle), et évalué grossièrement à 175 ng dans 10 μ L sur gel d'agarose. 4 μ L complétés à 100 μ L avec du PBST et dilués de 2 en 2 dans 100 μ L de PBST. Capture 1 h à la température de la pièce; suivie de 3 lavages au PBST.

Dénaturation de 10 min, à la température ambiante, avec 100 μ L de NaOH 0,25 M; suivie de trois lavages au PBST.

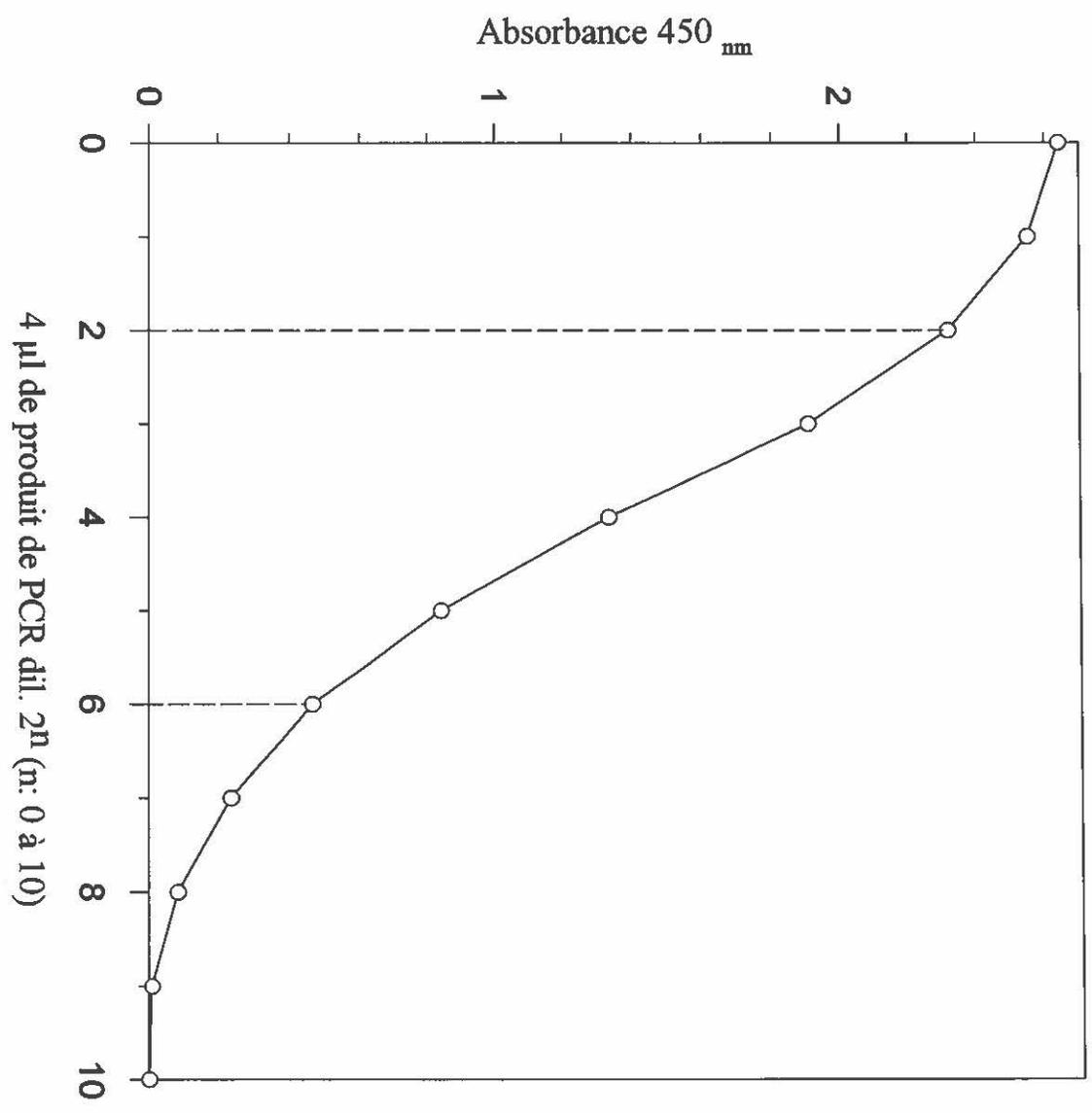
Hybridation de 100 fmoles / puits de sonde PPV-pr40-Dig diluée dans 100 μ L de SSPE 0,5X. Contact 1 h à 42°C; suivi de 3 lavages au PBST.

100 μ L de sérum de mouton anti-Dig, conjugué à la peroxydase, et dilué 1/1500 dans du PBST. Contact 1 h à la température de la pièce; suivi de 3 lavages au PBST.

100 μ L d'un mélange 1:1 de TMB:H₂O₂. 45 min de développement à température ambiante. Arrêt de la réaction avec 50 μ L de H₂SO₄ 2 N.

Lectures à 450 nm vs des "blancs" ne contenant pas d'acide nucléique.

μ L	4	2	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
diluti	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰
fmoles	300	150	75	37,5	18,8	9,4	4,7	2,3	1,2	0,6	0,3
DO	2,641	2,551	2,319	1,907	1,337	0,841	0,467	0,238	0,085	0,010	0,002



d'hybridation optimales pour chacune des sondes utilisées dans ce projet ont été analysées par accroissements de 5°C, de 37°C à 62°C. PPV-pr44, employée en PCR quantitative, générait des niveaux de réponse comparables de 37°C à 47°C, et chutait définitivement au-delà de 57°C. PPV-pr40, destinée à des amplicons produits par PCR différentielle, offrait un pic de réponse à 47°C, pour elle aussi chuter dramatiquement à partir de 57°C.

Des deux systèmes immunologiques envisagés, la révélation directe (par un sérum de mouton anti-Dig conjugué à la peroxydase) s'est avérée supérieure. La révélation indirecte (par un sérum de mouton anti-Dig, suivi d'un sérum de chèvre anti-mouton conjugué à la peroxydase) n'a pas augmenté le niveau de sensibilité de l'épreuve; mais a, par contre, posé d'importants problèmes de bruit de fond. Différentes tentatives d'optimisation, quant aux dilutions de sérums et aux agents bloquants, n'ont pu éliminer l'interférence. Dans le meilleur des cas, le blocage à base de caséine en tampon Tris présentait des "blancs" ayant une DO d'environ 0,200 et des échantillons dont l'absorbance nette était sensiblement inférieure à celle obtenue par révélation directe.

Enfin, quelques vérifications supplémentaires ont été effectuées afin de s'assurer de la spécificité de l'épreuve ELISA. Différents produits de PCR, non biotinylés dans le cas du PPV et biotinylés dans le cas du HPV, ont été testés à des concentrations

atteignant 100 fmoles par cupule. Aucun d'entre eux n'a répondu: qu'il soit complémentaire à la sonde, mais non marqué; ou qu'il soit biotinylé, mais non complémentaire à la sonde employée.

3.3.2 Courbe standard et purification de produits de PCR

Il était d'usage d'accompagner chaque test ELISA d'une série de dilutions (en log 2) d'un produit de PCR biotinylé, précédemment débarassé des amorces libres et dosé au spectrophotomètre (Mat. et Méth., 4.2.3). Les résultats accumulés confirmaient les premières données quant à la "fenêtre" d'opération. Règle générale, la réponse était linéaire de 4 à 5 log 2, correspondant à une plage de produits de PCR de 5 à 160 fmoles. La limite inférieure de détection (DO de 0,050 à 0,100) variait entre 1 et 4 fmoles, et la limite supérieure (DO > 2,5) jouait entre 250 et 300 fmoles. Une certaine fluctuation des données était inévitable, compte tenu de la nature même de l'ELISA: stabilité de l'enrobage, vieillissement des réactifs (e.g. TMB/H₂O₂), durée et température des "contacts". À ce propos, des observations limitées laissaient voir que la demie-vie des plateaux enrobés et conservés à -20°C était d'environ 5 mois. Par contre, des échantillons capturés ont présenté des DO stables après 2 semaines de congélation.

Ayant constaté des aberrations dans la réponse en ELISA de produits de PCR purifiés par Magic™ PCR Preps de Promega, un test comparatif a été mené entre cette

trousse et le système de filtration sur membrane d'Amicon. Un assemblage de produits de PCR biotinylés de 1232 pb a été évalué au spectrophotomètre à 115 ng/ μ L. Naturellement, ce dosage était faussé à la hausse par les dimères d'amorces et la présence résiduelle des amorces et nucléotides libres. Deux aliquotes de 100 μ L ont respectivement été nettoyées à l'aide de chacun des systèmes de purification et récupérées dans le volume initial. L'évaluation par spectrophotométrie donnait 100 ng/ μ L pour Promega et 87 ng/ μ L pour Amicon. Sur gel d'agarose, les trois produits étaient équivalents. Des dilutions sériées de chacune des trois préparations ont été analysées en parallèle par ELISA, en prenant soin d'ajuster leurs concentrations de départ selon les données précitées. Le niveau moyen des absorbances du produit brut représentait 76% de celui obtenu avec Amicon, soit exactement le rapport de 87/115 ng/ μ L. Par contre, les absorbances du "Magic PCR Prep" étaient inférieures de 4 log 2 (16 fois) à celles d'Amicon. En accord avec les observations antérieures, ceci laissait supposer que plus de 90% des molécules de biotine étaient perdues au cours du processus de purification. Tous les étalons subséquents ont donc été purifiés à l'aide des filtres Centricon-100 d'Amicon.

3.3.3 Digestions enzymatiques

Les digestions enzymatiques étaient au coeur de la PCR quantitative détectée en ELISA: théoriquement, les amplicons de type sauvage devaient être éliminés par

coupure *EcoRI*, et ceux de type mutant devaient être coupés par *BamHI*. Pour un échantillon donné, la somme des absorbances obtenues suite à ces digestions devait égaler celle observée dans la cupule intacte, représentant la totalité des amplicons mesurés. Cette prémisse garantissait la qualité de la réaction. En effet, si la somme des absorbances des produits digérés était inférieure à celle du produit brut, une perte d'ADN pouvait être suspectée. Inversement, si le total des produits digérés était supérieur à l'absorbance du produit non coupé, des digestions partielles et/ou des hétéroduplex pouvaient être en cause. Dans les faits, tous ces scénarios ont été rencontrés, et de nombreux tests ont dû être envisagés afin de dégager les tendances générales.

Premièrement, des fluctuations d'absorbance, d'un puits à l'autre d'un même échantillon, obligeaient l'utilisation d'un triplicata de cupules pour chacune des opérations. Deuxièmement, la présence évidente d'effet de bordure ("edge effect") avait tendance à gonfler les absorbances des échantillons situés à la périphérie du plateau et contraignait donc une disposition soignée des produits à tester.

Le protocole de base consistait à capturer les amplicons 1 h à la température ambiante, puis à digérer les produits immobilisés, 1 h à 37°C, par ajout de 100 µL de tampon de restriction contenant l'enzyme déterminée. Afin de simplifier la méthode, une première approche visa à capturer et digérer les amplicons en une seule opération.

Pour ce faire, l'aliquote de produit de PCR était diluée dans le tampon de digestion contenant l'enzyme appropriée et 100 µL étaient déposés dans la cupule enrobée de streptavidine (0,5 U d'enzyme / puits). Après 1 h d'incubation à 37°C, les barrettes étaient lavées au PBST. Cette façon de faire produisait des absorbances un peu plus élevées (capture à 37°C), mais semblait aussi augmenter un bruit de fond pouvant être interprété tel une digestion partielle. Par exemple, un produit de PCR NADL-2, donnant des absorbances de 1,550 (non coupé) et 0,059 (coupé *EcoRI*), générait maintenant une réponse de 1,831 (non coupé) et 0,194 (coupé *EcoRI*). Dans le doute, cette démarche fut écartée et le protocole de base poursuivi.

De l'ensemble des tests de "digestion effectuée en plateau", deux caractéristiques ressortaient clairement: une grande quantité d'enzyme était nécessaire afin d'assurer une digestion complète (jusqu'à 10 U par cupule), et une interférence faisait que l'absorbance de la cupule contenant l'ADN théoriquement résistant à la coupure (e.g. matrice NADL-2 vs *BamHI*) était souvent supérieure à celle de l'ADN non coupé. La coexistence des deux phénomènes faisait que la somme des cupules "digérées" était régulièrement supérieure à celle de la cupule intacte (Tableau 8). Dans les deux cas, les problèmes étaient plus évidents avec *BamHI*. En effet, du jour où les deux enzymes ont été utilisées pour la première fois, il a vite fallu augmenter la concentration de *BamHI* pour obtenir des résultats comparables. De plus, l'interférence était plus souvent associée à cette dernière, même si les deux enzymes étaient toujours employées en quantités égales.

Tableau 8

Exemple de digestions effectuées en plateau (0,5 U par 100 µL)

ADN ¹	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	Total <i>E</i> + <i>B</i>	Non coupé
NADL-2	0,000	1,014	1,014	1,055
Kresse	0,001	0,663	0,664	0,656
Mutant #11	0,136 ²	0,015 ²	0,151	0,145
Mutant #22	0,286 ²	0,066 ²	0,352	0,343
NADL+Kresse	0,000	1,007	1,007	0,991
NADL + 11	0,046	0,726 ³	0,772	0,647
NADL + 22	0,123	0,807 ³	0,930	0,666
Kresse + 11	0,063	0,446	0,509	0,512
Kresse + 22	0,100	0,532	0,632 ⁴	0,597

¹ Différents ADN de départ amplifiés individuellement et en combinaisons 1:1.

² Résultats pouvant indiquer que l'ADN muté était contaminé d'ADN de type sauvage.

³ Interférence, où l'absorbance était plus élevée que celle de la cupule intacte.

⁴ Digestions partielles ou présence d'hétéroduplex.

Afin de contourner ce problème, les digestions enzymatiques ont été essayées en microtubes à centrifugation (tubes Eppendorf de 1,5 mL) incubés à 37°C. Subséquemment, les amplicons digérés étaient immobilisés à l'intérieur des cupules enrobées. Différents volumes réactionnels et concentrations d'enzyme furent utilisés, dépendant de la stratégie employée. Une première approche consistait à diluer les aliquotes nécessaires de produit de PCR dans un volume de tampon de digestion suffisant pour exécuter un triplicata ($\approx 400 \mu\text{L}$). La concentration finale en enzyme variait de 0,5 à $\approx 3 \text{ U}/100 \mu\text{L}$. Une seconde démarche réduisait le volume réactionnel à 50 μL ou moins: le produit de PCR était digéré, puis dilué de façon à obtenir un volume suffisant pour l'exécution en triplicata. Habituellement, la concentration finale en enzyme tournait autour de 1 U par 100 μL d'échantillon dilué.

Il ressortait de ces travaux que les digestions en microtubes étaient nettement plus efficaces que celles effectuées en plateau, particulièrement si le volume réactionnel était réduit au minimum (50 μL ou moins). Par contre, on notait une certaine "perte" d'ADN en ce sens que la somme des absorbances des cupules soumises à la digestion était souvent inférieure à celle de la cupule intacte (Tableaux 9a et 9b). Ce phénomène a été perçu chez tous les types d'échantillons (constructions de laboratoire et cas cliniques), et ne semblait pas être associé à une enzyme plus qu'à l'autre. Malgré les limitations du système, les digestions en microtubes ont donc été privilégiées au cours des tests ultérieurs.

Tableaux 9a et 9b

a) Concentrations d'enzymes et protocoles de digestion¹.

En plateau (volume réactionnel 100 µL)				En tubes (volume réactionnel 50 µL)					
Intact	Coupé <i>Bam</i>		Coupé <i>Eco</i>		Intact	Coupé <i>Bam</i>		Coupé <i>Eco</i>	
1,949	1 U	1,376	1 U	1,894	RT°: 2,079	0,1 U	1,349	0,1 U	2,175
	5 U	0,079	5 U	1,860		1 U	0,020	1 U	2,017
	10 U	0,052	10 U	1,898	37°C: 2,268	Note : à titre de contrôle, deux tubes non soumis à la digestion			
	20 U	0,051	20 U	2,014					

¹ Produit de PCR à partir d'ADN muté, devant normalement être coupé par *Bam*HI.

b) Digestions en microtubes: 10 U d'enzymes dans 350 µL de volume réactionnel.

ADN ¹ de départ	dilué dans du tampon TE				dilué dans extrait de foetus négatif au PPV			
	<i>Eco</i>	<i>Bam</i>	<i>E + B</i>	Intact	<i>Eco</i>	<i>Bam</i>	<i>E + B</i>	Intact
10 ⁶	2,321	0,088	2,409	2,510	2,473	0,090	2,563	2,649
10 ⁵	1,850	0,057	1,907	2,139	2,306	0,141	2,447	2,599
10 ⁴	0,520	0,006	0,526	0,665	1,783	0,108	1,891	1,951
10 ³	0,039	0,000	0,039	0,142	0,187	0,029	0,216	0,251
10 ²	0,023	0,000	0,023	0,093	0,000	0,015	0,015	0,050
10 ¹	0,028	0,000	0,028	0,044	0,000	0,062	0,062	0,031

¹ Molécules d'ADN muté (standard interne)

3.3.4 Hétéroduplex et réamplification

Certains cas de digestions partielles, où la somme des absorbances des cupules soumises aux enzymes de restriction était nettement supérieure à celle reliée à la cupule intacte, ne pouvaient être attribuables à une déficience du système de digestion employé. Lors de la coamplification d'ADN de types sauvage et mutant, particulièrement à concentrations élevées de départ, la formation d'hétéroduplex pouvait se produire. Ces molécules hybrides étaient, par définition, insensibles à la restriction enzymatique et faussaient les données obtenues en ELISA. Ce problème était généralement résolu en réamplifiant, pendant un nombre restreint de cycles, 1 μ L du produit de PCR de départ (Mat. et Meth., 4.2.2). En fait, un cycle seulement de réamplification, en augmentant l'aliquote utilisée en ELISA, était suffisant pour normaliser les résultats. Cependant, ceci n'éliminait pas forcément les distorsions précédemment décrites (Tableau 10).

3.4 Quelques données sur l'efficacité de la PCR

Comme chacune des épreuves ELISA était accompagnée d'une courbe standard, établie à l'aide d'un étalon dosé au spectrophotomètre (Résultats 3.3.2), il devenait possible de convertir l'absorbance d'un échantillon donné en ng ou en fmoles de produit de PCR de 397 pb. Lorsque la quantité initiale de matrice était connue, il s'ensuivait,

Tableau 10

Hétéroduplex et réamplification¹

ADN ²	Coupé <i>Eco</i> RI	Coupé <i>Bam</i> HI	Total <i>E</i> + <i>B</i>	Non coupé
Produits initiaux de PCR: aliquote de 1 µL testée en ELISA ³				
NADL-2	0,087	1,820	1,907	2,114
Mutant #11	1,850	0,087	1,937	2,065
NADL + 11	1,564	1,633	3,197 ⁴	2,160
Réamplification 1 cycle: aliquote de 3 µL testée en ELISA				
NADL-2	0,038	0,677	0,715	0,702
Mutant #11	0,656	0,023	0,679	0,677
NADL + 11	0,186	0,290	0,476	0,509
Réamplification 2 cycles: aliquote de 3 µL testée en ELISA				
NADL-2	0,011	1,033	1,044	1,077
Mutant #11	1,045	0,019	1,064	1,094
NADL + 11	0,391	0,513	0,904	0,828
Réamplification 5 cycles: aliquote de 0,5 µL testée en ELISA				
NADL-2	0,038	1,112	1,150	1,286
Mutant #11	1,159	0,036	1,195	1,192
NADL + 11	0,433	0,637	1,070	0,949

¹ Réamplification de 1 µL du produit de PCR initial dans un cocktail de 100 µL.

² Quantité égale d'ADN de départ pour chacune des matrices: 10⁷ molécules/5 µL. NADL + 11 était une combinaison 1:1 des deux matrices (2,5 µL + 2,5 µL).

³ Les digestions enzymatiques ont été faites en microtubes Eppendorf de 1,5 mL.

⁴ Exemple typique d'hétéroduplex, où *Eco* + *Bam* > ADN total non digéré.

À noter la différence d'efficacité dans l'amplification de NADL-2 et du #11 lorsque ceux-ci étaient combinés (*Eco* ≠ *Bam*), alors qu'elle était fort comparable lors des amplifications individuelles (*Eco* de l'un vs *Bam* de l'autre, et vice versa).

qu'à partir de ces deux données, l'efficacité de la réaction pouvait être calculée¹⁰. C'était le cas lors des tests portant sur les constructions de laboratoire connues et dosées, et aussi lors des réamplifications puisque l'aliquote de départ avait été quantifiée suite à la PCR initiale. Dans cette dernière situation, une certaine marge de jeu était inévitable car, même si les courbes standards étaient généralement consistantes, des fluctuations dans la réponse ELISA pouvaient biaiser l'évaluation.

Suite à la compilation de quelques tests en ce sens, il apparaissait que les différentes constructions de laboratoire (P17, K5R12, clones 11 et 22) étaient amplifiées avec une efficacité équivalente, lorsque prises individuellement. Par contre, il arrivait assez souvent que l'efficacité de la PCR diminuait lorsque deux matrices différentes étaient combinées à part égales. Dans ce cas, l'amplification de l'ADN muté semblait plus fréquemment être pénalisée que sa contrepartie sauvage. Le tableau 10 illustre bien cette situation: lors des réamplifications, P17 et #11 présentaient une efficacité individuelle équivalente, alors que celle-ci diminuait avec la combinaison des matrices. De plus, les absorbances relatives aux coupures *EcoRI* et *BamHI* indiquaient une présence plus grande d'ADN de type sauvage.

L'efficacité du système d'amplification utilisé en PCR quantitative a aussi été évaluée en regard de la quantité initiale d'ADN, de même qu'en fonction des premiers

¹⁰ Nombre final de molécules = Nombre initial X Efficacitéⁿ (n = nombre de cycles).

cycles d'amplification. Tout d'abord, il ressortait clairement que l'efficacité de la PCR était inversement proportionnelle à la quantité d'ADN employée: la limite théorique de 2 correspondant à l'emploi de 10 molécules de matrice, au départ de l'amplification (Tableau 11a). Alors que ces résultats étaient tout à fait en accord avec le principe de la PCR, les données relatives aux premiers cycles d'amplification étaient, pour le moins, déroutantes. À plusieurs reprises, lors de la réamplification de produits de PCR, l'efficacité de la réaction mesurée après 1, 2 et 5 cycles d'amplification a nettement dépassé la limite théorique de 2 (Tableau 11b). Faute de temps, nous n'avons malheureusement pas pu explorer sérieusement ce phénomène.

4. CAS CLINIQUES

4.1 Procédures d'extraction

Afin de déterminer la meilleure façon d'extraire le PPV des échantillons cliniques, cinq méthodes ont été pratiquées et testées en parallèle dans des conditions de PCR différentielle et quantitative (Mat. et Méth., 5.1.1 à 5.1.5). L'extraction au phénol-chloroforme-GuSCN en milieu acide (Mat. et Méth., 5.1.2) n'a donné aucun résultat avec les deux systèmes de PCR. Par contre, les quatre autres procédures ont permis de générer les produits de PCR attendus et ce, de manière fort comparable. La méthode utilisant la protéinase K (Mat. et Méth., 5.1.5) a été retenue à cause de son

Tableaux 11a et 11b

a) Efficacité de la PCR en fonction de la quantité d'ADN de départ.¹

Molécules au départ	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
Efficacité (30 cycles)	1,58	1,70	1,82	1,92	1,96	1,98	2,08

¹ Ce tableau représente une moyenne de quelques tests effectués à partir d'ADN de types sauvage (NADL-2 et Kresse) ou muté (clones #11 et #22), amplifiés individuellement. Règle générale, les données étaient consistantes et ne variaient pas selon le type de matrice utilisée.

b) Efficacité de la PCR en fonction des premiers cycles d'amplification¹.

Matrice d'ADN	Après 1 cycle	Après 2 cycles	Après 5 cycles
NADL-2	3,99	2,82	2,21
NADL-2	3,94	2,55	2,17
Mutant #11	4,52	2,80	2,21
NADL-2 + #11	2,47	1,97	1,95
Kresse + #11	2,23	2,07	1,99
NADL-2	-	2,13	-
Éch. clinique #115	-	2,20	-

¹ Données colligées lors de trois expériences différentes de réamplification. Dans le deuxième test, l'amplification initiale portait sur des quantités égales de NADL-2, Kresse, #11 et combinaisons 1:1 de matrices.

rendement légèrement supérieur en PCR différentielle (patrons plus nets), allié à sa rapidité d'exécution et son faible coût. Une version modifiée de cette dernière a finalement été adoptée lors de l'analyse des échantillons cliniques: le remplacement du tampon de digestion par le tampon "maison" dédié à la PCR, et l'utilisation d'environ 50 mg de tissus par mL de cocktail de digestion, assuraient une lyse complète de l'échantillon et généraient des produits de PCR forts et nets, tant en système quantitatif que différentiel.

4.2 PCR différentielle

Les conditions de PCR différentielle précédemment résumées (Résultats, 1.6) ont été légèrement modifiées lors de l'étude des cas cliniques. Afin d'assurer une expression équilibrée des différents amplicons, il s'est avéré nécessaire de réduire la concentration de l'amorce pr35(1) au tiers de celle employée avec les trois autres amorces du cocktail d'amplification. Cette modification n'avait aucun impact sur un ADN de type virulent, mais permettait plutôt de réduire l'intensité du fragment de 353 pb au profit de celui de 1232 pb, lors de l'amplification d'une matrice de type vaccinal (e.g. NADL-2).

Une centaine d'échantillons cliniques recueillis et testés selon les méthodes en usage dans le Service de diagnostic vétérinaire ont été vérifiés par PCR différentielle.

La presque totalité des spécimens provenaient de foetus porcins, momifiés ou non. De plus, un échantillon correspondait à un placenta, un deuxième provenait de lésions de dermatite isolées chez un porcelet, et un dernier se composait d'une portion de jéjunum provenant d'un porc diarrhéique. Sur les 119 échantillons de tissus testés par PCR, 113 n'ont présenté aucune bande significative sur gel d'agarose. Par contre, 3 ont montré un patron typique de PPV pathogène, et 3 autres ont présenté une ou plusieurs bandes pouvant être associées au virus (Tableau 12). Les six spécimens positifs ou douteux correspondaient tous à des échantillons déclarés positifs par culture cellulaire. La PCR différentielle appliquée aux 7 surnageants de cultures cellulaires positives a démontré que ces derniers contenaient tous du PPV de type virulent.

Comme vérification supplémentaire, 50 échantillons déclarés positifs par immunofluorescence, mais négatifs en culture cellulaire et en PCR différentielle, ont été vérifiés par PCR "classique" suivie d'un buvardage de type Southern (Mat. et Méth., 5.3). Alors que les contrôles (positifs et négatifs) ont donné les résultats attendus, aucun de ces cas cliniques n'a présenté des signes de positivité au PPV.

4.3 PCR quantitative

Une trentaine de spécimens, dont les 7 cas trouvés positifs en culture cellulaire et PCR différentielle, ont été analysés par PCR quantitative. Chaque réaction de 50 μ L

Tableau 12

Diagnostic "classique" et PCR différentielle

a) Compilation générale

	Positif	Négatif	Douteux	Non testé
Immunofluorescence	65	50	1	3
Culture cellulaire	7	110	0	2
PCR: directement sur tissus ¹	3	113	3	0
PCR: sur cultures cellulaires ²	7	0	0	110

¹Les 6 cas positifs et douteux correspondaient à des positifs en culture cellulaire.

²PCR différentielle effectuée sur les 7 cultures cellulaires positives: tous les échantillons ont présenté un profil de type virulent.

b) Cas positifs

Types d'échantillon	Cult. cell.	IF	PCR tissus	PCR c.cell.
Foetus porcin	positive	positive	positive	positive
Foetus porcin	positive	positive	positive	positive
Poumon d'avorton	positive	positive	douteuse	positive
Poumon d'avorton	positive	négative	douteuse	positive
Placenta	positive	négative	positive	positive
Peau (lésions dermatite)	positive	non testée	négative	positive
Jéjunum de porcelet	positive	non testée	douteuse	positive

contenait 5 µL d'échantillon auxquels était ajouté l'équivalent de 500 molécules de standard interne. Comme contrôles, 2 réactions ne contenaient que la quantité de standard interne, et 2 autres utilisaient de l'eau en guise de matrice. Le tout était amplifié durant 30 cycles, et 1 µL du produit final était testé par ELISA. Les digestions enzymatiques furent effectuées en microtubes à centrifugation (5 U d'enzymes dans 50 µL), et le tube correspondant à l'ADN non digéré était aussi incubé à 37°C durant 1 h. Un triplicata de cupules était utilisé pour chacune des manipulations en ELISA, et la moyenne des absorbances était considérée lors de la complilation finale (Tableau 13).

Observant les DO obtenues avec les standards internes 1 et 2, il fut décidé de considérer une absorbance-seuil de 0,100 pour les produits intacts comme indicatrice de réaction réussie. Pour être déclaré positif, tout échantillon additionné de standard interne devait avoir l'absorbance de la cupule soumise à *Bam*HI plus grande ou égale à celle de la cupule correspondante soumise à *Eco*RI. Enfin, la somme des absorbances "*Bam*HI + *Eco*RI" devait normalement égaler celle de la cupule intacte représentant la totalité des amplicons.

L'ensemble de ces conditions fut rarement respecté: 4 réactions étaient rejetées; à 18 reprises, la somme des absorbances était inférieure à celle du produit intact; à 4 autres occasions, la somme des absorbances était supérieure à celle du produit non digéré; enfin, des 6 cas de quasi-égalité, 3 correspondaient à des absorbances nulles.

Tableau 13

PCR quantitative (sur 30 échantillons additionnés de 500 molécules de standard interne)

Echan.	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>B + E</i>	Intact	Notes	Echan.	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>B + E</i>	Intact	Notes
Std.int. 1	0,000	0,111	0,111	0,148	500 mol. mutées	Négatif 1	0,000	0,000	0,000	0,006	PCR H ₂ O
Std.int. 2	0,002	0,177	0,179	0,171		Négatif 2	0,000	0,000	0,000	0,003	
#1	0,000	0,089	0,089	0,214	négatif	#16	0,005	0,059	0,064	0,143	négatif
#2	0,374	0,058	0,432	0,497	positif	#17	0,000	0,122	0,122	0,162	négatif
#3	0,089	0,259	0,348	0,344	négatif	#18	0,018	0,080	0,098	0,191	négatif
#4	0,241	0,084	0,325	0,376	positif	#19	***	0,569	N/A	***	positif
#5	0,000	0,031	0,031	0,069	rejeté	#20	***	0,403	N/A	***	positif
#6	0,089	0,147	0,236	0,185	négatif	#21	***	0,378	N/A	***	positif
#7	0,072	0,094	0,166	0,265	négatif	#22	***	0,404	N/A	***	positif
#8	0,029	0,212	0,241	0,153	négatif	#23	***	0,529	N/A	***	positif
#9	0,002	0,136	0,138	0,294	négatif	#24	0,000	0,102	0,102	0,145	négatif
#10	0,000	0,101	0,101	0,168	négatif	#25	0,042	0,145	0,187	0,117	négatif
#11	***	0,431	N/A	***	positif	#26	0,000	0,084	0,084	0,185	négatif
#12	0,078	0,057	0,135	0,265	?	#27	0,000	0,131	0,131	0,142	négatif
#13	0,193	0,037	0,230	0,276	positif	#28	0,020	0,005	0,025	0,066	rejeté
#14	0,000	0,099	0,099	0,139	négatif	#29	0,000	0,013	0,013	0,043	rejeté
#15	0,026	0,177	0,203	0,108	négatif	#30	0,000	0,000	0,000	0,006	rejeté

- Numéros ombragés: surageants de cultures cellulaires

***Absorbances excédant les limites du spectrophotomètre

- Résultat rejeté, si l'absorbance de la cupule intacte d'un échantillon additionné de standard interne était inférieure à 0,100

- Résultat positif, si l'absorbance de la cupule soumise à *Bam*HI était plus grande ou égale à celle de la cupule soumise à *Eco*RI

- Résultat négatif, si l'absorbance de la cupule soumise à *Bam*HI était inférieure à celle de la cupule soumise à *Eco*RI

De plus, on notait des fluctuations importantes au niveau de l'ensemble des absorbances obtenues suite à la digestion par *EcoRI*: ces DO étant représentatives de la quantité commune de standard interne. La compilation de 26 résultats (exclusion faite des témoins négatifs et des 6 cas de réponses excessives) présentait une absorbance moyenne de 0,100 et un écart-type de 0,063 générant donc un coefficient de variation de 63%.

Malgré ces restrictions, il était quand même possible de statuer sur la présence ou non de PPV dans la plupart des échantillons. Il fallait d'abord exclure les 4 réactions rejetées, de même que le #12 dont la somme des absorbances "digérées" et presque égales était nettement inférieure à celle de la cupule intacte. Des cas restants, 16 étaient négatifs et 9 positifs. De ces derniers, 7 avaient déjà été identifiés par PCR différentielle (nos. 11, 13, 19 à 23). Par contre, les #2 et #4 semblaient être des positifs faibles ayant pu échapper à la culture cellulaire et à la PCR différentielle dont l'efficacité était moindre que celle de la PCR quantitative. Faute de temps, et compte tenu des raffinements à apporter à la méthode, le travail a été discontinué.

DISCUSSION

1. PCR DIFFÉRENTIELLE

Tel que décrit brièvement à la section 8.1 de la Revue bibliographique, plusieurs méthodes utilisant la PCR ont été développées dans le but de détecter des séquences mutantes connues. Ainsi, "l'amplification spécifique d'allèle" est aujourd'hui couramment utilisée pour amplifier des gènes mutants rares ne différant parfois de l'allèle de type sauvage que par la substitution d'un seul nucléotide. Une amorce complémentaire à l'allèle mutant, mais formant un mésappariement à son extrémité 3' avec la séquence de type sauvage, sert à copier l'ADN muté. L'amplification sélective de ce dernier, en présence d'un vaste excès de matrice de type sauvage, exige donc que la polymérase employée allonge et amplifie préférentiellement un complexe amorce-matrice dont l'extrémité 3' est parfaitement appariée. Dans un autre ordre d'idée, l'amplification simultanée de différentes séquences cibles, à l'intérieur d'un génome donné, est devenue de plus en plus courante en médecine et en sciences légales (e.g. "DNA fingerprinting"). L'utilisation de cette PCR multiplex implique cependant que l'amplification d'une séquence cible particulière ne souffre pas de la coamplification des autres séquences présentes dans le même cocktail. C'est en se basant sur de telles prémisses que la PCR différentielle pour les PPV a été élaborée.

1.1 *Choix des amorces*

Compte tenu de la nature et des objectifs de la PCR différentielle, le choix des amorces extérieures était somme toute assez restreint. Idéalement, l'amorce de droite devait se situer après la répétition de 127 nt, sise tout près de l'extrémité 5' du génome viral avirulent. De cette façon, l'amplicon généré à partir des deux amorces externes serait non seulement indicatif de PPV, mais aussi révélateur du type de virus rencontré. L'absence de la répétition, habituellement associée au PPV virulent (Bergeron *et al.*, 1996), produirait un amplicon tronqué de plus de 100 nt et par conséquent potentiellement discernable sur gel d'agarose. L'amorce pr6 a donc été choisie immédiatement en aval de la répétition, tout en évitant les séquences redondantes de A/T ou G/C fréquentes dans le palindrome terminal. Ainsi placée, elle produirait un amplicon d'environ 800 ou 900 pb en combinaison avec une des deux amorces discriminantes. L'amorce extérieure gauche, quant à elle, devait forcément se trouver en amont des deux mutations ponctuelles (positions 3942 et 3958), tout en étant positionnée de sorte que les fragments générés (par conjonction à pr6 et par conjonction à une des deux amorces discriminantes) soient de tailles "compatibles" avec l'ensemble du test. Le fait de remonter le génome, à partir des mutations ponctuelles choisies, déterminait la longueur du petit fragment discriminant (qui devait être inférieur à 800 pb), et celle du grand fragment généré par les amorces extérieures. Ce dernier n'avait pas intérêt à devenir trop long, car la différence de 127 nt entre les deux types de

génomique viral deviendrait vite indiscernable sur gel d'agarose. De plus, l'efficacité générale de la réaction en souffrirait; celle-ci étant globalement inversement proportionnelle à la taille des fragments amplifiés (Jeffreys *et al.*, 1988; Chelly *et al.*, 1990). L'amorce pr10 répondait à ces contraintes en générant respectivement des fragments de 1232 et 1105 pb avec les génomes avirulent et virulent du PPV, tout en produisant un petit fragment discriminant de 353 pb, par opposition au grand fragment discriminant de 800 ou 900 pb. Enfin, les amorces extérieures ont été choisies de façon à répondre le plus adéquatement possible aux critères de performance généralement acceptés pour ce type de molécules (revue par Innis et Gelfand, 1990). Leur longueur et leur séquence déterminaient aussi un T_m commun légèrement supérieur à celui des amorces internes, et ce sans même tenir compte des mésappariements introduits sur ces dernières; de telle sorte que l'optimisation ultérieure de la PCR différentielle en vue d'assurer la discrimination des génomes repose essentiellement sur le comportement des amorces intérieures.

Le positionnement de ces dernières n'avait rien de problématique: voulant exploiter l'impact d'un faux appariement à l'extrémité 3' de l'amorce, les deux oligonucléotides discriminants devaient se terminer à l'emplacement des mutations ponctuelles, elles-mêmes séparées par une quinzaine de bases. À l'évidence, l'amorce devant "remonter" le génome ne pouvait avoir son extrémité 3' à la position 3942 et celle devant le "descendre" ne pouvait avoir son extrémité 3' à la position 3958, car les

deux amorces se seraient ainsi recouvertes et auraient partagé 15 nucléotides complémentaires. L'amorce ascendante devait donc se terminer en 3' à la position 3958, et l'amorce descendante à la position 3942. Heureusement, la séquence génomique couvrant ces régions ne posait pas de problèmes majeurs quant au "design" des amorces (Innis et Gelfand, 1990). En fait, les deux régions présentaient un profil équivalent en termes de motifs et de composition en nucléotides; ce qui facilitait l'ajustement des T_m respectifs. Par contre, le choix d'une amorce discriminante virulente ou avirulente en fonction d'une des deux mutations ponctuelles présentait différentes possibilités. Il fallait donc décider arbitrairement si l'amorce interne ascendante serait dessinée en fonction d'une séquence génomique de type virulent ou avirulent et appliquer le corollaire logique à l'amorce interne descendante. Ce choix n'avait que peu d'impact sur la longueur des amplicons générés: seul le grand fragment discriminant passait de 937 pb à 810 pb (absence de la répétition de 127 nt) selon que l'amorce descendante, ayant son extrémité 3' à la position 3942, était destinée à un génome de type avirulent ou virulent. Par contre, la stratégie adoptée déterminait automatiquement le type de mésappariement occasionné entre l'amorce discriminante et son génome non apparié.

Différents chercheurs (Kwok *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1992) ont évalué l'impact des mésappariements entre la terminaison 3' de l'amorce et la matrice d'ADN, lors d'une réaction de PCR. À peu de choses près, leurs résultats se corroborent et font ressortir que tous les faux appariements n'ont pas un poids identique quant à l'élongation du néo-

brin par la polymérase *Taq*. Contrairement à la présomption généralement admise, certains mésappariements sont loin d'être fatals, étant même à l'occasion presque aussi propices à l'élongation que les combinaisons modèles de Watson-Crick. Le tableau suivant résume les travaux précités:

Matrice d'ADN	Watson -Crick	Impact des mésappariements en PCR ¹	
		Permis	Fatals
T	A	C, G, T	
C	G	A,T	C
G	C	T	A, G
A	T	C	G, (A)

¹Adapté de Tijssen, 1993

Naturellement, ces résultats ont été obtenus à l'intérieur de contextes spécifiques (conditions de PCR données, séquences génomiques particulières) et devaient être envisagés comme outils de pronostic dans l'élaboration d'une PCR différentielle.

À la lumière de ces données, il apparaissait cependant que peu importe la stratégie employée dans le cas des PPV, la majorité des mésappariements possibles (3 sur 4) seraient de type permis. Nous avons donc décidé de vérifier les prévisions, tout en nous réservant la possibilité d'augmenter le degré de difficulté de l'élongation du brin non apparié. En ajoutant volontairement un faux appariement à l'avant-dernier nucléotide en 3' des amorces discriminantes, le génome apparié rencontrerait un mésappariement suivi d'une combinaison Watson-Crick, alors que le génome non apparié serait confronté à deux mésappariements successifs. Les deux stratégies de

PCR différentielle (Figures 6 et 7) ont donc été élaborées en augmentant progressivement le coefficient de difficulté en fonction des mésappariements (Tableau 14).

Les résultats obtenus ont confirmé les hypothèses. Lors de la première stratégie de PCR, presque toutes les paires d'amorces testées individuellement ont permis l'amplification non seulement de leur ADN cible, mais aussi celle de l'ADN variant. Seule pr29 M2 (destinée à NADL-2) a réussi à éliminer le signal de 810 pb généré par Kresse avec les versions M1 et M3. Il semble donc qu'à l'exception de pr29 M2, dans les conditions de PCR alors utilisées, même une suite de deux mésappariements de type permis n'était pas suffisante pour empêcher l'élongation. Seul le doublet de faux appariements A/C (amorce/matrice) s'est avéré fatal. Par contre, en combinaison de quatre amorces, aucune des versions de pr29 n'a réussi à amplifier le fragment de 810 pb à partir de matrice virulente (alors que les deux versions de pr28 "virulentes" continuaient à amplifier le petit fragment de 353 pb avec NADL-2). Il est fort probable que ce phénomène tenait beaucoup plus au fait que l'amplification, toujours très efficace, du petit fragment de 353 pb affectait négativement celle de l'amplicon "illégitime" de 810 pb, tout comme elle réduisait celle du fragment "légitime" de 1105 pb. Enfin, il est intéressant de rappeler que, dans la plupart des cas, la hausse de la température d'hybridation de 45°C à 55°C avait plus tendance à réduire l'intensité des signaux qu'à résoudre les problèmes de non spécificité comme telle. Ce point sera discuté à la section suivante.

Tableau 14

Valeur relative des mésappariements utilisés lors de la PCR différentielle

PCR différentielle			Avant-dernier nucléotide en 3'			Dernier nucléotide en 3'				
	Amorce	Cible ¹	Amorce	Génome commun	Cote ²	Amorce	Génome cible	Cote	Génome variant	Cote
pr28M2	Vir.	C	T	Permis	T	A	W.C.	C	Permis	
pr29M1	Avir.	G	C	W.C.	A	T	W.C.	C	Permis	
pr29M2	Avir.	A	C	Permis	A	T	W.C.	C	Permis	
pr29M3	Avir.	T	C	Permis	A	T	W.C.	C	Permis	
2 ^e stratégie	pr34	Vir.	C	C	Fatal	G	C	W.C.	T	Permis
	pr35(1)	Avir.	T	T	Permis	G	C	W.C.	A	Fatal
	pr35(2) ³	Avir.	T	T	Permis	G	C	W.C.	A	Fatal
	pr35(3) ³	Avir.	T	T	Permis	G	C	W.C.	A	Fatal

¹ Amorce conforme au génome virulent (Vir.) ou avirulent (Avir.) du PPV (Bergeron *et al.*, 1993 et 1996).

² Type d'appariement ou de mésappariement (W.C. = Watson-Crick).

³ De plus, ces deux amorces outrepassaient la mutation d'un nucléotide supplémentaire en 3': C pour (2) et G pour (3), face à une matrice commune présentant un A. Dans le cas de pr35 (2), ce mésappariement était permis; alors qu'il était fatal pour pr35 (3).

La deuxième stratégie de PCR différentielle était nettement plus contraignante: cette fois, des mésappariements de type fatal étaient utilisés conjointement à ceux de type permis. Face au génome avirulent, pr34 présentait une finale de deux faux appariements respectivement fatal et permis; alors que face au génome virulent, pr35 (1) alignait en 3' deux faux appariements respectivement permis et fatal. L'influence combinée de ces mésappariements assura, dès le départ, une excellente discrimination des génomes variants, sans pour cela nuire à l'amplification des génomes cibles. Malgré la présence d'un mésappariement, même fatal dans le cas de pr34, à l'avant-dernier nucléotide en 3', les deux amorces discriminantes présentaient un appariement terminal G:C face à leur génome respectif. Cette liaison particulièrement forte devait stabiliser le complexe amorce-cible et assurer une élongation efficace du génome choisi.

Enfin, dans le but de réduire l'expression du petit fragment de 353 pb généré par pr10 et pr35 avec une matrice avirulente, les versions (2) et (3) de l'amorce discriminante ont été dessinées de façon à outrepasser la mutation ponctuelle d'un nucléotide supplémentaire en 3'. Pr35(2) présentait une finale mésappariement permis-appariement [G:C]-mésappariement permis, alors que pr35(3) se terminait ultimement par un mésappariement fatal. Dans les deux cas, il a été possible malgré tout de générer l'amplicon; mais l'amplification répétée de ce dernier était nettement trop erratique pour poursuivre dans cette voie. Ces scénarios semblaient donc représenter une situation limite entre l'effet stabilisateur d'une liaison GC et la déstabilisation du complexe par la présence de mésappariements de part et d'autre de ce lien.

1.2 Température d'hybridation

Lors de la mise au point de la PCR différentielle, différents essais ont été faits à des températures d'hybridation de 45°C et de 55°C. Étonnamment, les tests à température plus élevée n'ont pas empêché les amorces discriminantes de produire, la plupart du temps, leurs amplicons respectifs. Pourtant, sans même tenir compte des faux appariements introduits, ces dernières avaient un T_m théorique d'environ 50°C selon la formule "complexe" suivante (voir Résultats, section 1.3):

$$T_m = \frac{T_a \times \Delta H^\circ}{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ + RT_a \ln[C_i]} + 16,6 \log_{10} \frac{[\text{sels}]}{1 + 0,7 [\text{sels}]} - 269,3$$

Lors du calcul initial, la concentration en sels tenait compte uniquement des cations monovalents du tampon (KCl à 0,050 M). Or, dans leurs calculs de T_m d'hybrides amorce-matrice, Wetmur et Sninsky (1995) quantifient l'effet des cations divalents dû à la présence du $MgCl_2$: $[\text{sels}] = [K^+] + 4 [Mg^{++}]^{0,5}$. Avec des concentrations de KCl de 0,050 M et de $MgCl_2$ de 0,0015 M, toutes autres choses étant égales, les T_m précités augmentent de 9,5°C. En estimant grossièrement l'effet des mésappariements à une baisse de 1°C de la température de fusion pour chaque 1% de faux appariements (Dyson, 1991), le T_m des amorces discriminantes devrait baisser de 4,5°C par mésappariement. À la lumière de ces pondérations, il apparaît maintenant concevable que les amorces, même non parfaitement appariées, puissent suffisamment s'hybrider pour assurer l'élongation subséquente.

Éventuellement, une stratégie exploitant la température d'hybridation aurait pu être envisagée pour discriminer les génomes du PPV. Celle-ci aurait consisté à utiliser, lors des cycles initiaux de la PCR différentielle, une température d'une dizaine de degrés plus élevée que le T_m théorique des amorces discriminantes. Ultérieurement, la température d'hybridation aurait été réduite de 1°C à chaque 2 cycles pour finalement rejoindre la température de fusion idéale pendant les 15 derniers cycles. En déstabilisant ainsi, en début de PCR, les complexes "amorces discriminantes-matrices" il est fort probable que l'expression des fragments générés à partir des amorces externes ait été augmentée. Par contre, il n'est pas évident que les premières hybridations impliquant les amorces discriminantes auraient favorisé automatiquement celle ayant le plus de complémentarité au gabarit amplifié.

En effet, dans une étude récente de M.F. Goodman (1995), portant sur la fidélité des polymérase à ADN et l'élongation des mésappariements, l'auteur a analysé les implications mathématiques de la cinétique de polymérisation et dégagé des conclusions pertinentes à la PCR différentielle des PPV. Premièrement, les données accumulées suggèrent que les polymérase se fixent globalement avec la même affinité aux extrémités appariées et non appariées des complexes amorce-matrice. Deuxièmement, l'efficacité de l'élongation subséquente dépend bien entendu de la "processivité" de l'enzyme choisie (quantité moyenne de nt insérés suite à chaque fixation de l'enzyme au complexe amorce-matrice), mais surtout, dans le cas qui nous intéresse, de la facilité

pour la polymérase à allonger ou non un faux appariement donné. Troisièmement, cette différence dans la cinétique de la réaction est indépendante de la température d'hybridation. Cette dernière affecte évidemment la stabilité du complexe amorce-matrice, mais non l'impact des mésappariements comme tel. Ce qui fait que, lors de tests menés en ce sens, la hausse des températures d'hybridation de 45°C à 55°C avait une influence sur le rendement général de l'amplification en PCR différentielle, mais ne résolvait pas les problèmes de discrimination entre les différents génomes du PPV.

1.3 Discrimination et dNTP

Tout au long de la mise au point de la PCR différentielle, la concentration de dNTP a été maintenue à 0,2 mM pour chacune d'entre elles; soit une concentration totale de 0,8 mM de substrat pour la polymérase *Taq*. Nous respectons en cela les recommandations du fabricant quant à l'activité optimale de l'enzyme. Cependant, ce paramètre aurait pu être modifié dans l'optique d'une PCR différentielle. En effet, la spécificité d'une amplification sélective d'allèle est dépendante de la quantité disponible de dNTP: plus celle-ci est élevée, plus les faux appariements sont allongés avec une efficacité équivalente à celle des appariements Watson-Crick (Ehlen et Dubeau, 1989; Mendelman *et al.*, 1990). Le maximum de discrimination, quant à l'élongation d'un néo-brin par une polymérase, est obtenu lorsque la concentration du substrat tend vers zéro (Goodman, 1995). Donc, jouer sur la concentration des

nucléotides aurait pu être une alternative à l'ajout d'un second mésappariement lors de la PCR différentielle des PPV.

Cette option n'a pas été retenue, principalement pour des considérations relatives à l'efficacité globale de la PCR. La concentration de dNTP a une influence directe sur la quantité optimale de $MgCl_2$ devant être utilisée en PCR: chaque nucléotide monopolisant un ion Mg^{++} , la quantité totale de $MgCl_2$ aurait dû être réduite pour maintenir la même spécificité, affectant du coup l'équilibre général de la réaction. La concentration en $MgCl_2$ affecte directement le T_m des amorces et requiert des ajustements de température d'hybridation afin d'éviter les faux amorçages. Enfin, la concentration optimale de $MgCl_2$ peut différer d'un lot à l'autre de polymérase *Taq* (Tijssen, 1993). L'ajustement fin de la PCR différentielle, en vue d'obtenir le maximum de spécificité et d'efficacité, étant suffisamment exigeant; il nous semblait plus prometteur de nous concentrer sur le "design" des amorces.

1.4 Équilibre des amplicons

Une difficulté majeure rencontrée tout au long de la mise au point de la deuxième stratégie de PCR différentielle fut la sous représentation systématique du fragment de 1232 pb par rapport à l'amplicon de 353 pb, tous deux générés à partir de matrice avirulente NADL-2. Non seulement le petit fragment discriminant était-il

toujours fortement exprimé, mais sa présence même réduisait l'amplification du grand fragment. Ce phénomène avait aussi été perçu, quoique de façon nettement plus limitée, lors de la première stratégie de PCR différentielle, alors que la matrice était de type virulent (Kresse). À l'opposé, le grand fragment discriminant de 810 ou 937 pb (selon la stratégie employée) n'a jamais semblé interférer avec la coamplification de l'amplicon provenant des amorces extérieures.

La PCR différentielle est une forme de PCR "multiplex": plus d'une paire d'amorces sont utilisées conjointement afin de générer plusieurs amplicons possibles. Cependant, elle diffère du modèle courant en ce sens qu'une seule région de l'ADN génomique sert de base à l'amplification. Il y a donc chevauchement des amplicons produits. En ce sens, la PCR différentielle ressemble à une "nested PCR" effectuée en une seule étape. Une interdépendance s'établit entre les amplifications simultanées et peut favoriser l'expression du fragment interne. En cours de PCR, le fragment discriminant généré à un cycle donné devient sa propre matrice au cycle suivant. Il en est de même pour l'amplicon provenant des amorces extérieures; sauf que ce dernier, de même qu'une certaine proportion d'amplicons partiels, peuvent aussi servir de gabarit à l'amplification du fragment discriminant. De plus, la faible taille de ce dernier (353 pb) fait qu'il est toujours amplifié plus rapidement et plus efficacement que celui de 1232 pb. Comme le processus est exponentiel, il peut y avoir rapidement une nette différence favorisant l'accumulation de petits fragments, auxquels viennent s'ajouter les

amplicons extérieurs, comme cible potentielle. À la limite, comme l'ont observé plusieurs chercheurs (Goswami *et al.*, 1994; Piatak *et al.*, 1993; Menzo *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1990), la matrice présente en excès peut inhiber l'amplification de la matrice sous représentée. Cette interférence avait moins de chance d'être perçue entre le grand fragment discriminant et l'amplicon extérieur, leurs tailles semblables réduisant les différences potentielles d'efficacité entre les deux amplicons.

Cependant, ces considérations ne peuvent que partiellement éclairer les différences de comportement observées entre les deux types de génome amplifiés: non seulement la compétition grand brin-petit brin était-elle moins évidente lorsque la matrice Kresse était utilisée (lors de la première stratégie de PCR différentielle), mais le seul emploi des amorces extérieures a presque constamment favorisé l'expression du fragment de 1105 pb par opposition à celui de 1232 pb généré par NADL-2. La différence de longueur de 127 nt peut difficilement expliquer la sous représentation de NADL-2 tant en PCR à deux amorces extérieures qu'en PCR différentielle. Il est vrai que dans le dernier cas, un rapport 353/1232 pb était plus défavorisant, pour le grand fragment, qu'un rapport 353/1105 pb. De plus, dans la première stratégie, l'appariement terminal 3' de l'amorce discriminante présentait une combinaison T:A; alors que dans la seconde, cet appariement présentait une liaison G:C. On peut supposer que le complexe amorce-matrice plus stable de la deuxième stratégie, allié à un rapport 353/1232 pb, concouraient à accentuer la différence d'efficacité lors de la

coamplification des deux fragments. Malgré tout, cela ne rend pas compte des différences observées lors de l'amplification utilisant les seules amorces extérieures.

La présence ou non de la répétition de 127 nt, en plus d'affecter la longueur des amplicons générés, pouvait aussi modifier la structure secondaire du génome à amplifier et par conséquent avoir un impact sur l'efficacité de la réaction. Les tests menés avec l'amorce extérieure pr30, située en amont de la répétition, ont infirmé cette hypothèse; les résultats obtenus demeurant essentiellement les mêmes. Mise à part la répétition, seules quatre mutations ponctuelles distinguaient les deux génomes dans la région couverte par la PCR différentielle. Les deux premières étaient situées à 3942 et 3958 et servaient de base au test, une troisième se trouvait à 4115, et la dernière occupait la position 4503 tout près de la répétition. Il est difficile de concevoir que ces seules modifications puissent influencer suffisamment la structure secondaire du génome pour ensuite affecter la réaction d'amplification. Naturellement, on ne peut éliminer l'introduction possible d'un biais dans l'analyse (e.g. conservation des ADN, quantification des matrices), même si des efforts d'uniformité ont été maintenus tout au long des manipulations.

1.5 Conditions d'opération et "modus operandi"

Finalement, ce n'est que grâce à l'amélioration de l'efficacité générale de la PCR

différentielle que l'équilibre des amplicons a pu être réalisé. Les essais, au départ infructueux, de calibration de la réponse par modification des concentrations d'amorces ont pu être raffinés lors de l'application de la méthode aux échantillons cliniques. Une fois les conditions générales améliorées, la réduction de la concentration de l'amorce interne pr35(1) au tiers de celle employée avec les trois autres amorces du cocktail d'amplification assura une expression balancée des différents amplicons. En réduisant statistiquement les chances de rencontre entre la matrice avirulente et l'amorce discriminante, l'expression du petit fragment était défavorisée au profit de l'amplification générée par les amorces extérieures, trois fois plus nombreuses.

L'optimisation des conditions d'opération a eu un impact déterminant sur l'efficacité et la spécificité de la PCR différentielle. La baisse de pH du tampon d'amplification (de 9,0 à 8,5, à 25°C) améliora l'efficacité générale de la réaction, en accord avec l'observation voulant que l'activité optimale de la polymérase *Taq* se situe à un pH aux environs de 8,3 (Innis et Gelfand, 1990). De la même façon, l'ajout de 1% de Tween-20 a clairement augmenté les rendements en PCR. Il est difficile de cerner exactement les mécanismes d'action des cosolvants, car ceux-ci peuvent affecter plusieurs paramètres de la réaction (e.g. dénaturation de l'ADN cible, élimination de structures secondaires présentes dans les amorces ou la matrice, modification des T_m , stabilité de l'enzyme). Dans le cas du Tween-20, il est permis de penser que la présence de détergent non-ionique affecte l'activité de la polymérase en assurant, par exemple,

une meilleure distribution des molécules. Enfin, l'ajustement des concentrations de $MgCl_2$ et de *Taq* a défini le compromis optimal entre spécificité et efficacité. Il était clair que l'accroissement de ces deux réactifs causait une augmentation de la réponse, mais tel que prévu, celle-ci perdait de sa spécificité. À trop favoriser l'amorçage, la PCR perdait son caractère différentiel.

L'utilisation d'un départ à chaud ("hot start") employant une barrière de paraffine, plutôt que l'assemblage complet des réactifs à la température ambiante, visait essentiellement à réduire la formation de dimères d'amorces et à augmenter l'efficacité des premiers cycles d'amplification (Mullis, 1991; D'Aquila *et al.*, 1991). De cette façon, l'ADN, les dNTP et le $MgCl_2$ se retrouvaient dans la phase inférieure; alors que la *Taq*, les amorces et le KCl occupaient la phase supérieure. Isolés par la paraffine, les différents éléments n'entraient en contact que très au-delà de la température d'appariement des amorces. De plus, le premier cycle de PCR comportait une dénaturation de 1:30 min à 96°C, par opposition aux cycles suivants de 1 min à 94°C, afin d'assurer une dénaturation complète de la cible et une convection adéquate des deux phases. Cette façon de faire, en plus d'être d'utilisation commode, assura la spécificité des amorçages en tout début de PCR, précisément où la discrimination est la plus importante. En effet, un faux amorçage à cet endroit génère un néo-brin "illégitime" qui ne sera plus reconnu comme tel lors des cycles subséquents.

1.6 Application aux cas cliniques

1.6.1 Procédures d'extraction

Des cinq méthodes testées en parallèle (Mat. et Méth., 5.1.1 à 5.1.5), seule l'extraction au phénol-chloroforme-GuSCN en milieu acide n'a donné aucun résultat. Ceci confirme l'observation voulant qu'en conditions de phénol acide, la plupart des protéines et des petits fragments d'ADN (50 bases à 10 kb) se retrouvent dans la phase organique de l'extraction, alors que les longs fragments d'ADN et quelques protéines demeurent à l'interphase (CPMB, section 4.2). Il y avait donc peu de chances de retrouver le génome viral dans la phase aqueuse de l'extraction.

Des quatre autres méthodes, très comparables en terme de rendement en PCR, celle décrite par Hirt (1967) et adaptée au PPV par Molitor et collaborateurs (1984) assurait normalement l'extraction la plus propre. Cependant, un tel degré de purification de l'ADN viral, nécessitant en plus deux jours de travail, outrepassait les exigences de la méthode d'amplification. Les tests menés avec la protéinase K ou la lyse alcaline rapide se sont révélés à peu près aussi performants et nettement plus intéressants en terme de diagnostic (coût, nombre d'échantillons traitables en un temps relativement court, facilité d'exécution). La trousse "Elu-Quik DNA Purification Kit" quant à elle, quoique plus "propre" et presque aussi rapide que les deux dernières

méthodes, posait aussi certains inconvénients. Il était très difficile de lyser correctement les échantillons en utilisant les quantités prescrites des différents réactifs. Pour faciliter le travail, il aurait fallu augmenter ces quantités, et le coût par échantillon serait vite devenu prohibitif.

À tout prendre, les deux méthodes "grossières" d'extraction offraient le meilleur compromis. D'exécution rapide et peu coûteuses, elles permettaient tout de même une amplification équivalente à celle obtenue avec un ADN nettement plus purifié. Il est vrai que dans les deux cas, les méthodes rapides se terminaient par une incubation de 10 à 15 min à 95°C: ceci complétait sans doute la destruction de l'hémoglobine, des nucléases et autres protéines pouvant interférer avec la PCR. Finalement, comme l'extraction à la protéinase K générait des patrons plus nets en PCR différentielle, elle fut donc préférée à la lyse alcaline rapide comme outil régulier de diagnostic. La dernière modification apportée à la méthode choisie (remplacement du tampon de lyse par le tampon "maison" de PCR) visait à éliminer l'impact possible de la présence d'EDTA (chélateur pour le Mg^{++}) et de NaCl ([C] en sels affectant les T_m) lors de l'amplification. Ce changement diminua légèrement l'efficacité de la digestion enzymatique, mais augmenta l'intensité des bandes obtenues après PCR. Même si le tampon "maison" n'était pas optimal pour la protéinase K, il était, par définition, mieux adapté à l'amplification subséquente.

1.6.2 Diagnostic par PCR différentielle

Telle que nous l'avons conçue, la PCR différentielle n'était pas destinée à servir d'outil de première ligne pour le diagnostic des PPV: le but visé était de mettre au point un instrument d'analyse novateur permettant de distinguer les souches virulentes et avirulentes de PPV. La relative complexité du système ne permettait pas d'espérer, par exemple, une efficacité équivalente à celle d'une PCR classique générant un seul court fragment d'ADN. Malgré cela, la PCR différentielle appliquée directement aux 119 spécimens cliniques a permis d'identifier et de typer 3 cas positifs, en plus de repérer 3 autres cas douteux. Donc, un seul des 7 positifs isolés par culture cellulaire a échappé à la PCR différentielle. Par contre, utilisée comme outil de deuxième ligne, celle-ci a permis de clairement identifier les 7 PPV, tous de type virulent, présents dans les surnageants de culture cellulaire.

Une retombée non négligeable de cet exercice a été de remettre en question la validité des résultats issus de la technique d'immunofluorescence utilisée jusqu'alors dans le Service de diagnostic vétérinaire. En accord avec l'isolement sur cellules, la PCR différentielle identifiait près de 6% de positifs parmi les cas analysés; alors que l'IF appliquée aux coupes de tissus déclarait 56% des échantillons positifs au PPV. De plus, une PCR classique suivie d'un buvardage de type "Southern" effectuée sur une

cinquantaine de cas positifs en IF, mais négatifs en culture cellulaire et PCR différentielle, confirmait les dernières données. Il semblait évident que l'IF générât de faux positifs, tout comme elle déclarait de faux négatifs: 2 fois sur 5, relativement aux échantillons identifiés positivement par les deux autres méthodes (Tableau 12b).

Suite à ces données, des tests menés par le Service de diagnostic vétérinaire ont démontré que l'antisérum utilisé (anti-PPV polyclonal "maison", conjugué à la fluorescéine) réagissait de façon non spécifique avec des cellules non infectées. Des essais ultérieurs avec des antisérums monoclonaux (Veterinary Medical Research and Development, #3C9D11H11) et polyclonaux (National Veterinary Services Labs, Ames, #680-PDV-9001 et #681-PDV-9201) ont ramené le taux de positifs à des niveaux comparables à celui de la culture cellulaire. L'étude étant encore en cours, ces données ne sont donc pas définitives, mais le Service a quand même décidé de suspendre l'utilisation de l'antisérum "maison".

1.6.3 Cas de PPV entérique

La réplication des parvovirus autonomes présentant une dépendance absolue envers des cellules en phase S, il n'est pas étonnant que ces derniers aient un tropisme particulier pour des tissus à activité mitotique élevée. Ainsi, l'épithélium intestinal des mammifères est-il souvent la cible des parvovirus; sa destruction causant des problèmes

de diarrhée souvent mortels (revue par Pattison, 1990). Pourtant, très peu de données permettent d'associer le PPV à cette étiologie chez le porc.

En 1985, Dea et collaborateurs ont isolé des particules virales de 18 à 26 nm du contenu intestinal de porcelets atteints de diarrhée légère. L'activité hémagglutinante du virus était inhibée par des sérums anti-PPV et anti-CPV. Quelques années plus tard, lors d'une épidémie généralisée de diarrhée porcine, une équipe japonnaise (Yasuhara *et al.*, 1988) a identifié une particule de 27 nm ayant les propriétés physico-chimiques des parvovirus. L'isolat H-45 présentait 4 polypeptides comme le parvovirus bovin (contrairement à 3 chez le porc), mais aucun des antisérums employés (anti-BPV, anti-PPV, anti-CPV) ne parvenait à neutraliser le virus. Les auteurs conclurent à la présence d'un nouveau parvovirus porcine. Lors d'une seconde épidémie de diarrhée chez des porcelets, le même noyau de chercheurs (Yasuhara *et al.*, 1993) identifiait l'isolat 2277 dont les propriétés physico-chimiques, l'activité hémagglutinante et la croissance sur cellules étaient identiques à celles du précédent H-45. Cependant, les tests de séroneutralisation indiquaient que la souche 2277 était antigéniquement différente de la souche H-45, tout comme elle différait des BPV, PPV et CPV. Enfin, Duhamel et collaborateurs (1991) observèrent en microscopie électronique des particules cubiques, non enveloppées de 19 à 21 nm, dans le noyau de cellules cryptiques nécrosées provenant de l'épithélium intestinal de porcelets atteints de diarrhée sévère. Dans l'impossibilité de propager les particules en culture cellulaire, les tests d'hybridation

moléculaire, de PCR et d'IF effectués directement sur les tissus furent tous négatifs quant à la présence de PPV.

Ainsi, mise à part l'étude de Dea et collaborateurs, il semble n'exister aucune évidence claire d'un rôle étiologique déterminant du PPV dans la diarrhée chez le porc. Les données obtenues par PCR différentielle relativement à l'échantillon IAF 94-1083 peuvent faire progresser la discussion. La portion de jéjunum reçue provenait d'un porcelet issu d'un élevage de porcs à l'engrais d'environ 1050 têtes. Environ 200 d'entre eux, gros et petits, étaient atteints d'une diarrhée ne causant pas de mortalité, mais résistante aux traitements. Le Service de diagnostic vétérinaire isola, après passage sur cellules PT, un virus cytopathogène hémagglutinant pouvant être du PPV. Appliquée directement aux tissus soumis, la PCR différentielle permettait effectivement de suspecter la présence de ce virus. Lors de l'application au surnageant de culture cellulaire, celle-ci a clairement révélé la présence de PPV de type virulent. C'est, à notre connaissance, la première fois qu'un PPV entérique est identifié de façon moléculaire.

2. PCR UTILISÉE EN DIAGNOSTIC

2.1 *Étude de stabilité et présence d'inhibiteurs*

Plusieurs facteurs expérimentaux peuvent affecter l'efficacité de l'amplification. Comme le processus est de nature exponentielle, une très petite variation à ce niveau peut occasionner des différences dramatiques quant à la quantité finale de molécules produites. Malgré l'extrême sensibilité de la méthode, la présence d'inhibiteurs dans le cocktail d'amplification ou dans l'échantillon lui-même peut anéantir toute réaction. Plusieurs de ceux-ci ont déjà été identifiés: une trop forte concentration de $MgCl_2$, d'ions monovalents ou de dNTP; la présence de détergents ioniques, tel le SDS; les résidus de phénol; les protéases; les inhibiteurs organiques présents dans l'urine ou dans le sang (porphyrines), de même que l'héparine utilisée comme anticoagulant (revus dans PCR: Clinical Diagnostics and Research, chap. 4, 1992). Enfin, d'autres facteurs plus subtils, et souvent obscurs, peuvent modifier l'efficacité de la PCR. À cet égard, l'étude de stabilité de l'ADN entreprise au cours de ce projet de recherche a permis de confirmer certaines données, et d'apporter aussi quelques éléments nouveaux.

Premièrement, l'ensemble des résultats (Tableau 5) a bien fait ressortir les fluctuations d'efficacité inhérentes à la PCR: chacune des préparations (lyse "classique", Qiagen et Promega) a présenté des "trous" et des incohérences en terme de rendement.

Les tests reprenant 10 aliquotes identiques de certaines dilutions données (Tableau 6) n'ont fait que confirmer ces fluctuations. De plus, des variations inter tests importantes étaient directement reliées à la qualité des réactifs employés (e.g. stabilité aux jours 10 et 60). À ce niveau, l'étude supportait les données accumulées par maints chercheurs.

Aucune différence marquante quant à l'intégrité ou la stabilité de l'ADN ne pouvait être reliée à la méthode d'extraction: les trois offrant essentiellement le même degré de pureté et conséquemment un profil équivalent. Peut-être pourrait-on taxer le système Promega d'être un peu moins performant, mais la chose n'est pas évidente. De la même façon, que l'ADN soit conservé à 4°C ou à -20°C avec gel/dégel ne changeait pas vraiment le tableau. Dans les deux cas, ce n'est qu'après 3 mois de stabilité que le rendement a nettement diminué. Même un vieillissement accéléré misant sur la répétition des cycles de gel et dégel n'a pas accentué le processus, confirmant en cela des observations antérieures (March, 1990). Par contre, les trois séries à usage unique, congelées le jour de la manipulation initiale et destinées à un seul test, ont présenté un rendement sensiblement supérieur. Comme toutes les dilutions ont été faites dans de l'eau distillée, il est possible que la nature acide de l'ADN provoque à plus ou moins long terme, surtout si l'échantillon est fréquemment manipulé à température ambiante, une auto hydrolyse de la molécule. En ce sens, une conservation dans du tampon TE aurait été préférable. Finalement, même si l'absence de produits de PCR se retrouvait souvent aux dilutions les plus grandes, ce phénomène était sûrement plus

symptomatique de la limite d'efficacité du système que d'une perte éventuelle d'ADN due à une adhérence aux microtubes utilisés pour l'entreposage. D'ailleurs, des recherches en ce sens ont montré que de l'ADN aliquoté à -20°C , dans du TE, était stable (en regard de tests de PCR et de transformation bactérienne) durant 6 mois, à des dilutions allant jusqu'à 20 molécules par μL . Aucune perte d'ADN n'était reliée aux microtubes de polypropylène employés (Longo et Hartley, 1990).

Par contre, certaines dilutions spécifiques ont constamment mal répondu tout au long de l'étude de stabilité: plus particulièrement la dilution 4 de l'ADN purifié avec la trousse Promega (Résultats, 2.2). Alors que les tests de précipitation et resolubilisation de l'ADN ont infirmé l'hypothèse de l'agrégation de l'acide nucléique, les tentatives de transport d'inhibiteurs ont réussi à cerner le problème. Les résultats obtenus (Tableau 6 et Figure 9) indiquaient que la dilution 4, seule ou combinée aux dilutions adjacentes, nuisait à l'amplification; les "trous" en PCR étant presque exclusivement reliés à sa présence. Il apparaissait clairement que la dilution 4 contenait effectivement un inhibiteur de la PCR suffisamment puissant pour interférer avec une réaction "normale", suite au mélange 1 pour 1 des deux dilutions. Il est difficile de retracer l'origine de cet inhibiteur. Si ce dernier se trouvait dans la dilution 4 "mère", toutes les préparations de dilution 4 (conservées à 4°C , à -20°C et à usages uniques), de même que toutes les dilutions 5 subséquentes auraient dû souffrir de sa présence. Or, le Tableau 5 ne présente pas cette clarté. Il est possible que l'inhibiteur soit lié à certains tubes en

particulier (contaminants provenant de l'usinage du plastique?), comme il est possible qu'il provienne de l'embout ou de la pipette utilisée. En effet, les séries à 4°C et -20°C gel/dégel ont été distribuées avec la même pipette (Eppendorf 1000 µL), alors que les séries à usage unique nécessitaient un format plus petit (Eppendorf 100 µL). Une chose cependant demeure certaine: pendant toute l'étude de stabilité, des dilutions données ont systématiquement mal réagi en PCR, alors que d'autres ont sporadiquement failli à l'amplification. La présence d'inhibiteur était suffisamment claire dans le premier cas pour soupçonner le même type d'interférence dans le deuxième cas.

2.2 Contamination et faux positifs

La capacité de la PCR de produire, souvent à partir de traces d'ADN, un grand nombre de copies d'une séquence donnée exige qu'un soin extrême soit consacré à l'élimination des faux positifs. Même si ces derniers peuvent résulter d'une contamination horizontale (d'échantillon à échantillon), la source la plus sérieuse de faux positifs découle de la contamination verticale ("carry-over") provenant d'amplifications précédentes de la même cible. À cause du nombre impressionnant de copies générées, même une trace de produits de PCR peut occasionner de très graves problèmes de contamination. On ne se rend pas toujours bien compte du formidable pouvoir d'amplification de la PCR. Par exemple, le cas clinique #19 (surnageant de culture cellulaire d'un spécimen de peau; Résultats, Tableau 13) a été redosé par PCR

quantitative et estimé à 77,7 ng/ μ L. Pour un amplicon de 397 pb, ceci représente tout près de 10^{13} molécules dans un volume réactionnel de 50 μ L. Pour reprendre une idée de Kwok et Higuchi (1989), il est plus facile de réaliser l'importance de ce nombre en imaginant le contenu du tube déversé dans une piscine de dimensions olympiques (50 x 25 x 2 m). On retrouverait finalement 4 molécules dans chaque μ L d'eau du bassin. Lors d'un aérosol¹¹ créé à l'ouverture d'un tel tube de PCR, une seule gouttelette d'un diamètre de 10 microns (un demi-millionième de μ L) contiendrait 100 000 molécules éventuellement réamplifiables avec les mêmes amorces.

Tel que mentionné précédemment (Résultats, 3.2.2), nous avons éprouvé en cours de projet de très sérieux problèmes de contamination. Malgré des efforts intensifs pour remédier à la situation (isolement physique, nouveaux réactifs, décontamination des instruments par irradiation aux UV et traitement à l'hypochlorite de sodium), les contrôles ne contenant pas d'ADN généraient sporadiquement de faux positifs. Les mesures prises n'étaient donc pas totalement efficaces. Dans une telle situation, une méthode de stérilisation pré-PCR, disponible sous forme de trousse (GeneAmp PCR Carry-over Prevention Kit, Perkin-Elmer #808-0068), aurait peut-être grandement aidé à solutionner le problème. Basée sur les travaux de Longo et collaborateurs (1990), cette méthode substitue des dUTP aux dTTP durant l'amplification, générant des

¹¹Un aérosol peut voyager à plusieurs mètres de la source et contenir des particules d'un diamètre atteignant 20 microns (*Encyclopaedia Britannica*, 1986).

amplicons différents de l'ADN original par la présence de ce nucléotide non conventionnel. Ces produits de PCR, sources potentielles de contamination subséquente, sont éliminés par l'enzyme uracile-N-glycosylase (UNGase) qui excise l'uracile et ne permet plus à ces brins de servir de matrice. L'enzyme est ajoutée au cocktail de départ et, après une courte incubation à la température ambiante (excision), la chaleur atteinte lors du premier cycle de PCR assure la dégradation rapide des brins brisés et l'inactivation de la UNGase. Commence alors une nouvelle ronde de PCR, à partir de l'ADN intact (échantillon), et générant de nouveaux amplicons contenant des résidus uracile. La contamination verticale est ainsi éliminée d'une PCR à l'autre. Il est intéressant de noter que la présence d'uracile dans les amplicons ne nuit pas aux réactions d'hybridation, de séquençage par didéoxy-NTP ou de clonage (en autant que des bactéries *ung^r* soient utilisées). De plus, des enzymes de restriction telles *EcoRI* et *BamHI* continuent d'être opérantes (Sardelli, 1991).

2.3 Recommandations quant au contrôle de qualité

Les activités diagnostiques imposent des contraintes de base incontournables: idéalement, l'élimination totale des faux positifs et des faux négatifs, de même que la reproductibilité des résultats. Dans ce contexte, aussi séduisante soit-elle, l'utilisation de la PCR pose donc des problèmes majeurs; et, à défaut d'un contrôle de qualité extrêmement serré, vaudrait-t-il probablement mieux s'en tenir aux méthodes bien

établies. Peu d'études ont été menées sur la performance de la PCR en diagnostic, mais les données fournies par Hughes (1990), de même que Noordhoek et collaborateurs (1994), sont tout à fait éloquentes: dans les deux cas, des laboratoires hautement spécialisés et crédibles ont failli l'exercice imposé (Revue biblio., 6.5).

L'expérience acquise au cours de ce projet, et qui confirme de nombreuses données en ce sens à travers la littérature, nous incite à proposer certaines mesures essentielles en terme de contrôle de qualité. Au départ, tout laboratoire utilisant la PCR à des fins diagnostiques ou épidémiologiques devrait séparer ses opérations en trois lieux physiques distincts. Une première zone serait destinée à la réception et à la préparation des spécimens cliniques. Celle-ci pourrait aussi servir à l'extraction et à la purification éventuelle de l'acide nucléique. Une seconde zone serait dévolue à la préparation des cocktails pré-PCR et ne devrait en aucun cas servir à l'amplification comme telle ou à l'étude des produits de PCR. La dernière zone serait réservée à l'amplification et aux traitements post-PCR (e.g. électrophorèse). Les tubes servant à l'amplification, solidement fermés, ne devraient jamais être ouverts tant que la réaction n'est pas complétée; à plus forte raison durant le processus même d'amplification. Naturellement, ces tubes ne devraient jamais revenir dans les deux premières zones. Chacun de ces lieux physiques devrait être équipé avec ses propres pipettes et jouir de facilités d'entreposage distinctes. Afin de réduire les risques d'aérosols, l'emploi de pipettes à déplacement positif, ou à tout le moins d'embouts ART ("Aerosol Resistant

Tips"), devrait être obligatoire avec toute solution contenant de l'ADN. Enfin, tous les réactifs utilisés en PCR, particulièrement les amorces, devraient être répartis en aliquotes afin de prévenir une contamination massive. Globalement, l'ensemble des manipulations devrait être envisagé avec le même soin et les mêmes contraintes qu'impose la stérilité en culture cellulaire (Yap *et al.*, 1994).

De plus, il ne faut pas négliger l'importance des contrôles négatifs devant accompagner toute réaction de PCR. Idéalement, un échantillon représentatif, connu comme négatif certain, devrait accompagner l'ensemble des manipulations (de l'extraction de l'acide nucléique à la PCR comme telle) afin de visualiser les contaminations possibles dues à la préparation des spécimens. Plus important encore, lors de l'assemblage des cocktails, une série de tubes contenant tous les réactifs de la PCR, sauf l'ADN cible, devraient être intercalés à intervalle régulier (e.g. à tous les 10 échantillons). Ce système s'est révélé extrêmement sensible pour détecter la présence de contamination, car l'absence d'ADN exogène permet l'amplification efficace de séquences contaminantes, même à l'état de traces (Kwok, 1990).

La spécificité des résultats positifs devrait être vérifiée, soit par hybridation du produit de PCR (e.g. "Southern Blot"), soit par une seconde ronde de PCR utilisant des amorces internes. Des tests de digestion enzymatique peuvent aussi être envisagés si la séquence le permet. Dans le cas de résultats négatifs, la situation est plus complexe.

D'abord, un témoin positif plutôt faible, mais régulièrement amplifiable, devrait accompagner chacune des réactions afin d'évaluer la qualité globale de la PCR. Tout résultat négatif devrait être répété au cas où, par exemple, un inhibiteur sporadique aurait empêché la réaction. La présence d'inhibiteurs systématiques liés au spécimen clinique lui-même peut être visualisée par ajout de quantités connues et décroissantes de témoin positif au cocktail de réaction de l'échantillon. Comme on le voit, le processus est assez lourd.

Malgré toutes ces mesures, cependant, rien ne permet d'évaluer les fluctuations d'efficacité de tube à tube et de pondérer les résultats intra et inter tests. Il n'existe, à notre avis, qu'une seule façon de véritablement contrôler la qualité d'une réaction de PCR: il faut ajouter à chaque tube une quantité connue de standard interne et évaluer la réponse de l'échantillon en fonction de celle du standard. Cette démarche est essentiellement celle empruntée par la PCR quantitative. Même si le but ultime de cette dernière est de quantifier le nombre de copies originales d'une séquence donnée dans un échantillon particulier, il n'en demeure pas moins que *de facto*, le processus utilisé assure une mesure de la qualité de la réaction.

3. PCR QUANTITATIVE

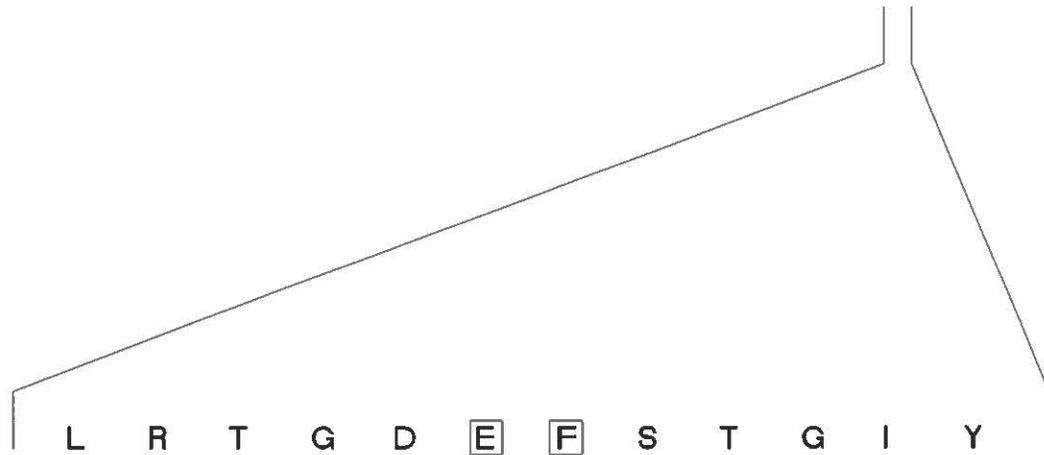
3.1 *Standard interne*

Tel que nous l'avons conçu, le standard interne devait idéalement répondre à deux objectifs précis. Premièrement, l'ADN muté (site *EcoRI* transformé en site *BamHI*) devait servir à transfecter des cellules porcines afin de produire un virus mutant utilisable comme contrôle interne lors de toutes les étapes aboutissant à la PCR quantitative. Deuxièmement, cette matrice devait se confondre avec le PPV sauvage et présenter la même efficacité lors de la PCR comme telle.

Il a été impossible de répondre au premier objectif. Suite aux nombreux essais de transfection, l'ADN muté n'était repéré faiblement par PCR que dans les surnageants de premiers passages cellulaires. Cette réponse provenait probablement d'une trace d'inoculum et aucune activité virale n'était perceptible par HA ou ECP (Tableau 7). La transformation du site de restriction se trouvait à muter, au niveau de la VP2 du PPV, un acide glutamique en glycine et une phénylalanine en sérine (Figure 12). Ces deux résidus occupaient les positions 260 et 261 de la séquence protéique (numérotation selon Chapman et Rossmann, 1993) et se retrouveraient, sur la structure secondaire du CPV, à la fin de la bulle entre les feuillets βF et βG (Figure 2). Près de la surface interne de la capsid, cette bulle correspond au repliement serré entre les deux feuillets β et se trouve tout près de l'axe de symétrie d'ordre cinq.

Figure 12

Amorce mutagène utilisée lors de la transformation du site *EcoRI* en site *BamHI*. L'acide glutamique "E" en position 260 est changé en glycine "G", et la phénylalanine "F" en position 261 est transformée en sérine "S" (numérotation des acides aminés au niveau de la VP2, selon Chapman et Rossmann, 1993). À noter que le remplacement d'une phénylalanine par une sérine impose une modification importante de l'hydrophobicité locale (+1,92 à -0,55).



PPV (VP2)

L R T G D **E** **F** S T G I Y
CTAAGAACAGGAGAT GAATTCTCCACAGGAATATAT

Amorce mutagène

Eco RI
Bam HI
5' AGAACAGGAGAT GGATCCTCCACAGGAATA 3'
R T G D **G** **S** S T G I

Les études de Chapman et Rossmann (1993 et 1995) ont démontré que cette région, la deuxième plus conservée parmi les parvovirus étudiés, est associée à la jonction des protomères et à un domaine d'interactions ADN viral/capside. Des mutations à ce niveau pourraient empêcher l'assemblage des capsides et/ou l'encapsidation de la progéniture virale. Récemment d'ailleurs, des modifications de résidus impliqués dans la jonction des sous-unités pentamériques ont empêché la formation de capsides et se sont révélées fatales à la réplication du CPV (Tresnan *et al.*, 1995). Il y a de fortes chances que la transformation du site *EcoRI* en site *BamHI* ait détruit l'infectivité du PPV et empêché toute transfection. Un test de "sauvetage" où, par mutagenèse dirigée, le site muté serait reconverti en site original pourrait normalement vérifier l'hypothèse.

Le deuxième objectif, quant à lui, n'a été que partiellement vérifié. Tel que mentionné précédemment (Résultats, 3.4), standard interne (clones 11 ou 22) et ADN de type sauvage (clones P17 et K5R12) étaient individuellement amplifiés avec une efficacité équivalente. Par contre, il arrivait assez souvent que l'efficacité de la PCR diminuait lorsque deux matrices étaient combinées à part égales. Dans ce cas, l'amplification de l'ADN muté semblait être plus particulièrement pénalisée. Dans un article clé, Raeymaekers (1993) a analysé les fondements mathématiques de la PCR quantitative et, à l'aide de simulations informatiques, a défini les limites de la stratégie. De plus, l'auteur y suggérait des tests essentiels afin de vérifier si standard interne et

ADN cible partageaient la même efficacité. Étant donné les problèmes de quantification liés aux digestions enzymatiques, il n'a pas été possible d'appliquer les exigences de Raeymaekers et de véritablement comparer les efficacités individuelles lorsque les matrices étaient coamplifiées. Ainsi, lors de la PCR quantitative appliquée à une trentaine de cas cliniques, la compilation des absorbances obtenues suite à la digestion par *EcoRI* (représentative de la quantité commune de standard interne) présentait un coefficient de variation de 63%. De telles fluctuations de la réponse en ELISA rendaient difficile une juste interprétation. Quoi qu'il en soit, on ne peut écarter une interaction possible lors de la coamplification des deux types de matrices et seul un système de discrimination fiable pourrait éclairer correctement la question.

3.2 Données supplémentaires quant à l'efficacité de la PCR

Les quelques tests mesurant l'efficacité de la PCR en regard de la quantité initiale d'ADN, de même qu'en fonction des premiers cycles d'amplification, soulèvent des questions intéressantes. Alors que dans le premier cas, la limite théorique de 2 était atteinte lors de l'emploi d'une quantité minimum de matrice de départ, cette même limite était régulièrement outrepassée lors de réamplifications portant sur quelques cycles. Il n'est pas étonnant que le maximum d'efficacité corresponde à un apport minimal d'ADN de départ. Tel qu'évoqué précédemment (Revue biblio., 6.2 et 6.3), le processus d'amplification n'est exponentiel que durant un certain nombre de cycles durant la PCR.

Cette fenêtre dépend essentiellement de la quantité initiale d'ADN: plus cette quantité est grande et plus vite la réaction plafonne. Dans un tel cas, l'efficacité moyenne demeure assez faible; alors que dans le cas contraire, la fenêtre s'élargit et l'efficacité moyenne tend à rejoindre la limite théorique.

Par contre, une efficacité dépassant la limite théorique de 2 contrevient à la logique mathématique définie par la PCR. Bien sûr, on ne peut nier le biais introduit par la méthode de quantification utilisée: la mesure indirecte via une courbe standard et la détection par ELISA, pour ne nommer que celles-là. Malgré tout, le phénomène était suffisamment apparent pour justifier une hypothèse. Les tests de réamplification portaient sur quelques cycles, entre 1 et 5, et se terminaient par une incubation finale d'environ 10 min à 72°C afin d'assurer une élongation complète de toutes les chaînes. La matrice de départ, tout comme les produits de PCR, correspondaient à des amplicons de 397 pb. La température d'appariement de tels polynucléotides est évaluée au T_m moins 25°C, alors que celle des amorces correspond au T_m moins 5°C (revue par Tijssen, 1993). Dans le cas présent, les deux valeurs approchaient les 55°C. Il est possible que durant l'incubation finale, la matrice soit partiellement en fusion et que des amorces réussissent à s'hybrider pour être immédiatement allongées par la polymérase. D'autant plus que la forte concentration de ces dernières les favorise au détriment du brin complémentaire. De cette façon, une amplification additionnelle pourrait se produire. Comme preuve, la répétition de ces tests avec des ADN plus longs, ayant un T_m plus élevé, devrait ramener l'efficacité à l'intérieur de la limite théorique.

3.3 Détection ELISA et digestions enzymatiques

Le système de détection en format ELISA développé au cours de ce projet présentait de nombreux avantages. Premièrement, à la sensibilité de la PCR s'ajoutait la spécificité de la sonde, ce qui est hautement souhaitable en terme de diagnostic. De plus, la simplicité de la détection comme telle n'exigeait aucun ajout aux facilités préexistantes dans le Service. Deuxièmement, et c'est là un point capital, la stratégie employée assurait non seulement un contrôle de la qualité de la PCR, mais aussi un contrôle de la qualité de la détection elle-même. L'égalité devant exister entre le signal de la cupule "intacte" et la somme des signaux provenant des cupules soumises aux restrictions enzymatiques permettait de déceler immédiatement une quelconque anomalie du système utilisé. Enfin, il était possible de déterminer un "cut-off" diagnostic en établissant, à l'aide du standard interne, une réponse minimale acceptable tenant compte des limites de la détection, et d'utiliser cette valeur-seuil pour statuer sur la positivité des échantillons (Tableau 13). À notre connaissance, il n'existe présentement aucune application clinique de la PCR offrant un tel contrôle de la qualité et répondant parfaitement aux exigences du diagnostic.

Malheureusement, cette démarche reposait grandement sur la fiabilité des digestions enzymatiques, et celles-ci ont causé des problèmes à plus d'un niveau. Au départ, le fait d'utiliser un standard interne presque en tout point identique à l'ADN cible

assurait *a priori* une efficacité commune des deux matrices, mais provoquait aussi l'apparition d'hétéroduplex. En soi, ce phénomène n'était pas dramatique puisque la stratégie de détection permettait de le visualiser. De plus, la sensibilité de l'ELISA était suffisante pour envisager une réamplification de quelques cycles afin de rétablir la situation. Dans les faits, cependant, le problème était plus complexe. Comme il arrivait très souvent que la somme des absorbances des cupules "digérées" dépasse celle de la cupule "intacte", il devenait très difficile de juger si la chose était due à la présence d'hétéroduplex ou tout simplement à des digestions enzymatiques inefficaces. Pour cette raison d'ailleurs, les digestions en plateau ont été abandonnées. Non seulement devait-on utiliser de fortes concentrations d'enzymes, mais il semblait évident que les digestions demeuraient partielles. Même en admettant une inefficacité égale pour les deux enzymes employées, la situation ne pouvait être tolérée. Si la quantité de standard interne était connue, celle de l'échantillon ne l'était pas; une digestion partielle pouvait donc affecter les deux matrices de façon nettement différente et introduire un biais inacceptable dans la quantification subséquente.

À l'inverse, lors de restrictions effectuées en microtubes à centrifugation, la somme des absorbances de produits digérés était régulièrement inférieure à celle des produits intacts. Cette "perte" d'ADN pouvait éventuellement s'expliquer de deux façons: par une activité non-spécifique des enzymes ("star activity"), ou par une adsorption de l'ADN aux tubes de plastique. Des tests utilisant jusqu'à 20 U d'enzymes

dans un volume de 100 μ L n'ont démontré aucune activité "étoile" de la part de chacune d'elles face à une matrice contenant le site de restriction inapproprié. D'autre part, des amplicons non digérés, mais incubés de façon identique aux produits digérés (tubes Eppendorf placés à 37°C), ont continué de présenter une absorbance supérieure à la somme des absorbances obtenues à partir des amplicons digérés. Il semble donc, et ceci va dans le sens d'observations précitées (Discussion, 2.1), qu'il n'y ait pas d'adsorption de l'ADN comme tel aux parois de polypropylène des tubes utilisés. Par contre, il est possible que la présence des enzymes, dans les tubes soumis à la restriction, permette cette adsorption. Si l'enzyme reste plus ou moins associée à l'ADN, la nature protéique de la première peut permettre une fixation au plastique. Des tests en ce sens (Stevenson *et al.*, 1994) ont démontré que plus de 50% d'une quantité de RNase H était adsorbée aux parois de tubes à microcentrifugation. L'ajout de Nonidet P-40 dans la solution réduisait cette perte à moins de 3%. La même remarque pourrait d'ailleurs éclairer pourquoi, lors de digestions en plateau, la somme des absorbances des cupules soumises aux enzymes était fréquemment supérieure à celle de la cupule "intacte". En admettant que l'enzyme reste associée à l'ADN coupé et qu'elle s'adsorbe aux parois de plastique de la cupule, les tronçons d'amplicons capturés deviendraient disponibles à l'hybridation subséquente et fausseraient les résultats à la hausse. Nonobstant les problèmes de digestions partielles ou d'hétéroduplex, les digestions en plateau souffraient d'une interférence particulièrement visible avec l'emploi de *Bam*HI. Il est possible que cette enzyme, en particulier, reste facilement associée à la matrice d'ADN.

L'ensemble des résultats obtenus par PCR compétitive suivie de quantification par ELISA, sur une trentaine de cas du champ (Résultats, 4.3), résume assez bien la situation. Même si *grosso modo* le test permet de distinguer les échantillons positifs, de nombreuses améliorations doivent être apportées pour que cette PCR quantitative puisse vraiment atteindre l'objectif de contrôle de la qualité. Les fluctuations inhérentes à l'ELISA, et plus encore les aléas attribuables aux digestions enzymatiques, posent de sérieux problèmes. En fait, peut-être vaudrait-il mieux abandonner l'idée d'une PCR quantitative utilisant les restrictions enzymatiques pour distinguer les matrices. Nous rejoignons en cela la position d'autres chercheurs (revue par Reischl et Kochanowski, 1995) et songeons plutôt à des solutions alternatives.

3.4 Alternatives possibles

Non seulement l'utilisation d'un standard interne offre-elle les meilleures chances de quantification précise en regard de la PCR, mais elle représente surtout le moyen le plus efficace pour juger de la qualité de la réaction. Aussi, maintenons-nous cette approche quantitative. À défaut d'utiliser les enzymes de restriction, l'emploi de deux sondes différentes pourrait servir à discriminer ADN cible et standard interne. Cette stratégie impose cependant de nouvelles contraintes. Premièrement, une courbe standard d'absorbance doit être établie vis-à-vis un étalon quantifié, et ce pour chacune des sondes; de sorte que le signal obtenu avec chacune d'elles puisse être relativé. De

plus, dans le cas qui nous intéresse, les deux matrices ne diffèrent que par le site de restriction modifié. Il serait donc difficile d'assurer la spécificité de l'hybridation en se basant sur une différence de deux nucléotides.

Ces prémisses obligent donc à réviser la nature du standard interne. Pour que deux sondes puissent être utilisées, il faut que le génome sauvage du PPV soit muté de telle sorte qu'au moins une courte séquence permette une hybridation différentielle. Une première stratégie pourrait consister à introduire une insertion dans le génome sauvage du PPV; celle-ci aurait intérêt à être brève pour ne pas défavoriser l'efficacité du standard interne. D'ailleurs, plusieurs techniques ingénieuses utilisant la PCR ont été décrites pour créer de telles insertions (Revue biblio., 7.1). Une seconde stratégie consisterait à transformer une portion de la séquence originale du génome viral. La mutagénèse dirigée utilisée au cours de ce projet pourrait être reprise pour créer une séquence restreinte, différente de l'ADN cible, mais équivalente en terme de T_m (influence du "plus proche voisin"; revue par Tijssen, 1993). Ceci faciliterait l'utilisation subséquente des deux sondes et uniformiserait éventuellement les réponses. Cependant, dans les deux scénarios, le standard interne ainsi dessiné s'éloignerait de l'ADN cible et des tests devraient être faits afin de démontrer que les deux gabarits partagent une efficacité commune (Raeymaekers, 1993). Il faut se rappeler que plus les deux matrices seront semblables, plus les efficacités seront identiques, mais plus grandes seront les probabilités de créer des hétéroduplex. Avec l'emploi de sondes

différentes, cependant, le problème ne se pose pas vraiment puisque les amplicons sont dénaturés et les hétéroduplex éliminés. D'un autre côté, des recherches ont démontré que des standards internes partageant les mêmes sites d'amorçage que l'ADN cible, mais totalement différents quant à la séquence entre ces sites, présentaient une cinétique d'amplification tout à fait similaire à la cible (Siebert et Larrick, 1993).

Par ailleurs, même une stratégie de PCR quantitative où les hétéroduplex ne seraient pas éliminés pourrait être envisageable. Le véritable problème, dans ce cas, tient au fait que ceux-ci ne sont pas facilement quantifiables, et que l'addition ou la soustraction de cette inconnue ne faussera pas la quantification qu'à la condition que standard interne et ADN cible soient présents dans un rapport 1:1. À partir du moment où la mesure des hétéroduplex devient possible, il est aisé de corriger les données relatives à l'ADN cible et au standard interne en ajoutant à chacun la moitié de la valeur obtenue avec ces derniers. Dans un article très récent (1996), Hayward-Lester et collaborateurs ont utilisé la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour séparer et doser des produits de PCR quantitative utilisant un standard interne. Une aliquote de 10 μ L de produits de PCR était analysée en 6 minutes et générait 3 pics (ADN cible, standard interne et hétéroduplex) isolés et individuellement quantifiés. Tel que démontré par les auteurs, la séparation par HPLC pourrait devenir rapidement un moyen particulièrement bien adapté à la quantification des produits de PCR. L'utilisation de colonnes échangeuses d'anions permet une séparation de résolution au

moins équivalente aux plus fines résolutions obtenues par électrophorèse. La quantification se fait par intégration numérique des pics de densité optique à 260 nm en sortie de colonne. Ce signal a l'avantage de présenter une bonne linéarité sur plusieurs ordres de grandeur, tout en ayant une limite de sensibilité inférieure au nanogramme. Elle ne nécessite aucun marquage particulier des amorces, ni de procédure particulière en cours d'amplification. De plus, comme la mesure est directe, cette méthode est la seule à mesurer de manière absolue des quantités d'ADN. Il n'est donc plus nécessaire de reporter les résultats sur des courbes standards provenant d'étalons connus. De surcroît, une chromatographie HPLC est facilement automatisable, elle est rapide et permet, éventuellement, la récupération pour une utilisation ultérieure des fragments après séparation. Autant d'avantages qui en justifieraient l'investissement dans un laboratoire utilisant la PCR à des fins diagnostiques.

CONCLUSION

Il n'existe présentement aucun test pouvant discriminer les nombreuses souches de PPV. Malgré des différences frappantes de pathogénicité, les méthodes usuelles de diagnostic ne parviennent pas à distinguer antigéniquement les variants viraux. Aussi, en l'absence d'anticorps monoclonaux spécifiques, les connaissances acquises sur la biologie moléculaire des PPV représentent-elles la seule alternative possible en terme de dépistage. La PCR différentielle développée au cours de ce projet permet, pour la première fois, de distinguer rapidement les souches virulentes et avirulentes de PPV. L'utilisation routinière de ce nouvel outil diagnostique pourrait éventuellement avoir des retombées intéressantes à plusieurs niveaux.

Premièrement, une saine gestion des troupeaux exige une prévention efficace de la maladie. Les données obtenues par PCR différentielle, utilisées conjointement à celles du praticien sur le dossier "immunologique" des animaux, pourraient permettre de juger de l'efficacité des vaccins présentement utilisés. Il n'est pas évident que les souches atténuées ou inactivées de PPV avirulent protègent adéquatement des PPV hautement virulents, telle la souche Kresse. Cette dernière peut tuer le fœtus, même immunocompétent. Deuxièmement, les études épidémiologiques gagneraient en fiabilité si le type de virus impliqué dans un épisode de PPV était clairement défini. On raffinerait ainsi l'étiologie de la maladie. De plus, il serait intéressant de vérifier une synergie possible entre d'autres pathogènes porcins et les différents types de PPV, en regard des pathogénicités observées. Troisièmement, la PCR différentielle peut être

d'une aide précieuse pour suivre l'évolution du PPV. Chez les parvovirus autonomes, de très petites variations génomiques ou des mutations ponctuelles peuvent conduire à des tropismes différents au niveau des tissus affectés ou même de l'hôte visé (Truyen et Parrish, 1995), tout comme à des variations importantes de pathogénicité. Les vaccins atténués ne sont d'ailleurs peut-être pas étrangers à l'évolution virale et des réarrangements génomiques entre souches vaccinales et sauvages sont aussi à considérer (Revue biblio., section 5). Pour toutes ces raisons, le développement et l'utilisation diagnostique d'outils moléculaires distinguant les souches de parvovirus représentent sûrement un investissement rentable (Parrish, 1995).

Dans l'immédiat, la mise au point de la PCR différentielle a eu des retombées importantes pour le Service de diagnostic virologique. Elle a d'abord permis de questionner la validité de la technique d'immunofluorescence en usage dans le Service, amenant l'adoption de mesures correctrices. Elle a aussi défini une procédure simple et rapide quant à la préparation des échantillons cliniques en vue de diagnostic par PCR. Enfin, la PCR différentielle nous a permis d'identifier clairement la présence de PPV pathogène dans un spécimen entérique provenant de porcs diarrhéiques.

D'une façon plus large, le développement et la mise au point de la PCR différentielle nous ont amené à confronter nos observations à celles de nombreux autres chercheurs et à mieux définir les possibilités et limites de cette technologie en fonction

d'un service de diagnostic. Une conclusion s'imposait d'elle-même: les avantages indéniables liés à la PCR sont directement proportionnels aux soins consacrés à son contrôle de qualité. Différentes mesures, allant de l'aménagement physique du laboratoire aux différents témoins devant accompagner chacune des réactions, ont été abordées dans les chapitres précédents. Tous ces efforts visant à éliminer les faux positifs et les faux négatifs, aussi valables soient-ils, doivent être doublés d'une stratégie assurant une mesure de la qualité de la réaction, si l'on veut obtenir un véritable encadrement de la PCR.

Pour ce faire, nous avons opté pour un modèle de PCR quantitative où l'échantillon et le standard interne ne diffèrent que par un site de restriction et compétitionnent donc pour les mêmes amorces. Nous visions ainsi une efficacité commune pour les deux matrices. Les retombées immédiates de cette stratégie furent le développement d'une PCR "classique" efficace et d'un système de quantification de l'ADN de format ELISA. L'exercice nous a aussi permis d'évaluer l'applicabilité d'une discrimination des matrices basée sur les digestions enzymatiques. Même si nous devons rejeter cette option, nous maintenons la pertinence de l'approche quantitative comme mesure de contrôle de qualité de la PCR. Des alternatives à la restriction enzymatique sont possibles et méritent une poursuite de la recherche.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier le Dr Peter Tijssen pour m'avoir incité à entreprendre les études de maîtrise et pour avoir, par la suite, dirigé ce projet de recherche. Je lui suis particulièrement reconnaissant de la confiance qu'il m'a témoignée. Je tiens également à remercier mon codirecteur, le Dr Grégoire Marsolais, pour avoir endossé le projet et modifié ses priorités en tenant compte de mes études. Je profite aussi de l'occasion pour souligner l'implication financière du MAPAQ tout au long de cette démarche.

Je m'en voudrais de passer sous silence la contribution du Dr Jean Bergeron, dont la constante amitié et les précieux conseils ne sont certes pas étrangers à l'aboutissement de ce travail. Je souhaite également dire merci à Benoît Hébert pour avoir encadré mon inculture informatique et au Dr François Shareck qui n'a jamais ménagé ses efforts afin d'offrir un service de synthèse des oligos plus qu'efficace.

Je suis aussi redevable à tous mes collègues, techniciennes et étudiants, qui chacun à leur façon ont supporté mon travail. Je pense particulièrement à la contribution indispensable de Mme Raymonde Jetté à l'établissement du projet.

Enfin, pour leur compréhension et leur support dans le quotidien, je tiens à remercier mes parents et amis; tout spécialement, Joanne Roger, sans qui je n'aurais peut-être pas eu le courage et la discipline d'aller jusqu'au bout.

BIBLIOGRAPHIE

AGBANDJE, M., R. MCKENNA, M.G. ROSSMANN, M.L. STRASSHEIM & C.R. PARRISH. 1993. Structure determination of feline panleukopenia virus empty particules. *Proteins* 16:155-171.

ALARD, P., O. LANTZ, M. SEBAGH, C.F. CALVO, D. WEILL, G. CHAVANEL, A. SENIK & B. CARPENTIER. 1993. A versatile ELISA-PCR assay for mRNA quantitation from a few cells. *BioTechniques* 15:730-737.

AOKI, S., R. YARCHOAN, R.V. THOMAS, J.M. PLUDA, K. MARCZYK, S. BRODER & H. MITSUYA. 1990. Quantitative analysis of HIV-1 proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with AIDS and ARC: decrease of proviral DNA content following treatment with 2', 3' dideoxyinosine (ddI). *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 6:1331-1339.

ARNHEIM, N. & H. ERLICH. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 131-156.

ARNOLD, L.J., P.W. HAMMOND, W.A. WISE & N.C. NELSON. 1989. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin. Chem.* 35:1588-1594.

ARRIGO, S.J., S. WEITSMAN, J.D. ROSENBLATT & I.S. CHEN. 1989. Analysis of rev gene function on human immunodeficiency virus type 1 replication in lymphoid cells by using a quantitative polymerase chain reaction method. *J. Virol.* 63:4875-4881.

ASTELL, C.R., M.B. CHOW & D.C. WARD. 1985. Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggest a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *J. Virol.* 54:171-177.

ASTELL, C.R., E.M. GARDINER & P. TATTERSALL. 1986. DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVMi, and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J. Virol.* 57:656-669.

BAGNARELLI, P., S. MENZO, A. MANZIN, P.E. VARALDO, M. MONTRONI, M. GIACCA & M. CLEMENTI. 1991. Detection of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 32:31-39.

BALL-GOODRICH, L.J. & P. TATTERSALL. 1992. Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mouse. *J. Virol.* 66:3415-3423.

BECKER-ANDRÉ, M. & K. HAHNBROCK. 1989. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR): a novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res.* 17:9437-9446.

BELAK, S. & A. BALLAGI-PORDANY. 1993a. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Comm.* 17:55-72.

BELAK, S. & A. BALLAGI-PORDANY. 1993b. Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. *Mol. Cell. Probes.* 7:241-248.

BERGERON, J., J. MENEZES & P. TIJSSEN. 1993. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* 197:86-98.

BERGERON, J., B. HÉBERT & P. TIJSSEN. 1996. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J. Virol.* 70:2508-2515.

BERNS, K.J. 1990. Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* 54:316-329.

BLOOM, M.E., B.D. BERRY, W. WEI, S. PERRYMAN & J.B. WOLFINBARGER. 1993. Characterization of chimeric full-length molecular clones of Aleutian Mink disease parvovirus (ADV): identification of a determinant governing replication in cell culture. *J. Virol.* 67:5976-5988.

BOURGUIGNON, G.J., P.J. TATTERSALL & D.C. WARD. 1976. DNA of minute virus of mice: self-priming, non-permuted, single-stranded genome with a 5' terminal hairpin duplex. *J. Virol.* 20:290-306.

BROWN, C.S., S. WELLING-WESTER, M. FEULBRIEF, J.W.M. VAN LENT & W.J.M. SPAAN. 1994. Chimeric parvovirus B19 capsids for the presentation of foreign epitopes. *Virology* 198:477-488.

CELI, F.S., M.E. ZENILMAN & A.R. SHULDINER. 1993. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:1047.

CHA, R.S., H. ZARBL, P. KEOHAVONG & W.G. THILLY. 1992. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-*ras* gene. *PCR Methods Appl.* 2:14-20.

- CHAMBERLAIN, J.S., R.A. GIBBS, J.E. RANIER, P.N. NGUYEN & C.T. CASKEY. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16:11141-11156.
- CHANG, S.F., J.Y. SGRO & C.R. PARRISH. 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J. Virol.* 66:6858-6867.
- CHAPMAN, M.S. & M.G. ROSSMANN. 1993. Structure, sequence, and function relationship correlations among parvoviruses. *Virology* 194:491-508.
- CHAPMAN, M.S. & M.G. ROSSMANN. 1995. Single-stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus. *Structure* 3:151-162.
- CHEHAB, F.F., M. DOHERTY, S. CAI, Y.W. KAN, S. COOPER & E.M. RUBIN. 1987. Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias. *Nature* 329:293-294.
- CHELLY, J., J.C. KAPLAN, P. MAIRE, S. GAUTRON & A. KAHN. 1988. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 333:858-860.
- CHELLY, J., J.-P. CONCORDET, J.-C. KAPLAN & A. KAHN. 1989. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2617-2621.
- CHELLY, J., D. MONTARRAS, C. PINSET, Y. BERWALD-NETTER, J.-C. KAPLAN & A. KAHN. 1990. Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction - application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur. J. Biochem.* 187:691-698.
- CHEVRIER, D., S.R. RASMUSSEN & J.L. GUESDON. 1993. PCR product quantification by non-radioactive hybridization procedures using an oligonucleotide covalently bound to microwells. *Mol. Cell. Probes* 7:187-187.
- CHOI, C.S., H.S. JOO & T.W. MOLITOR. 1987. Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Vet. Microbiol.* 15:19-29.
- CHOMCZYNSKI, P. & N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

- CLERICI, M. & G.M. SHEARER. 1993. The T_H1 - T_H2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 14:107-110.
- CLERICI, M. & G.M. SHEARER. 1994. The T_H1 - T_H2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol. Today* 15:575-581.
- CLINTON, G.M., M. HAYASHI. 1976. The parvovirus MVM: a comparison of heavy and light particle infectivity and their density conversion *in vitro*. *Virology* 74:57-63.
- COLEMEN, G.L., R.O. JACOBY, P.N. BHATT, A.L. SMITH & A.M. JONAS. 1983. Naturally occurring lethal parvovirus infection of juvenile and young-adult rats. *Vet. Pathol.* 20:49-56.
- COTMORE, S.F., L.J. STURZENBECKER & P. TATTERSALL. 1983. The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural proteins in addition to its capsid polypeptides. *Virology* 129:333-343.
- COTMORE, S.F. & P. TATTERSALL. 1987. The autonomously replicating parvovirus of vertebrates. *Adv. Virus Res.* 33:91-174.
- COTMORE, S.F. & P. TATTERSALL. 1989. A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J. Virol.* 63:3902-3911.
- COTMORE, S.F. & P. TATTERSALL. 1990. Alternate splicing in a parvovirus nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localisation and turnover characteristics. *Virology* 177:477-487.
- COTMORE, S.F. & P. TATTERSALL. 1994. An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO J.* 13:4145-4152.
- CPMB: Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, II et III. Mise à jour 1995. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl (éds.). John Wiley & Sons, Inc. New York. NY.
- CUTLIP, R.C. & W.L. MENGELING. 1975. Pathogenesis of *in utero* infection of eight and ten-week old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* 36:1751-1754.

D'AQUILA, R.T., L.J. BECHTEL, J.A. VIDELER, J.J. ERON, P. GORCZYCA & J.C. CAPLAN. 1991. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res.* 19:3749.

DEA, S., M.A.S.Y. ELAZHARY, G.P. MARTINEAU & J. VAILLANCOURT. 1985. Parvovirus-like particules associated with diarrhea in unweaned piglets. *Can. J. Comp. Med.* 49:343-345.

DENG, W.P. & J.A. NICKOLOFF. 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200:81-88.

DIVIACCO, S., P. NORIO, L. ZENTILIN, S. MENZO, M. CLEMENTI, G. BIAMONTI, S. RIVA, A. FALASCHI & M. GIACCA. 1992. A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene* 122:313-320.

DUHAMEL G.E., T.W. BARGAR, B.J. SCHMITT, T.W. MOLITOR & W. LU. 1991. Identification of parvovirus-like virus particles in intestinal crypt epithelial cells of pigs with diarrhea. *J. Vet. Invest.* 3:96-98.

DUNNE, H.W., J.C. GOBBLE, J.R. HOKANSON, D.C. KRADEL & G.R. BUBASH. 1965. Porcine reproductive failure associated with a newly defined "SMEDI" group of picornaviruses. *Am. J. Vet. Res.* 26:1284-1290.

DYSON, N.J. 1991. Dans: *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*. T.A. Brown (éd). Vol. 2. Oxford University Press, Oxford.

EHLEN, T. & L. DUBEAU. 1989. Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, inosine-containing oligonucleotide primers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160:441-447.

ERLICH, H.A., D. GELFAND & J.J. SNINSKY. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252:1643-1651.

FERRE, F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods and Applications* 2:1-9.

FERRE, F., A. MARCHESE, P.C. DUFFY, D.E. LEWIS, M.R. WALLACE, H.J. BEECHAM, K.G. BURNETT, F.C. JENSEN & D.J. CARLO. 1992. Quantitation of HIV viral Burden by PCR in HIV seropositive Navy personnel representing Walter Reed staging 1 to 6. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 8:269-275.

FRIEDHOFF, P., M. HAHN, H. WOLFES & A. PINGOUD. 1993. Quantitative polymerase chain reaction with oligodeoxynucleotide ligation assay/enzyme-linked immunosorbent assay detection. *Anal. Biochem.* 215:9-16.

FRYE, R.A., C.C. BENZ & E. LIU. 1989. Deletion of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. *Oncogene* 4:1153-1157.

GAILLARD, C. & F. STRAUSS. 1990. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res.* 18:378.

GALLINELLA, G., M. ANDERSON, N.S. YOUNG & K.E. BROWN. 1995. Human parvovirus B19 can infect cynomolgus monkey marrow cells in tissue culture. *J. Virol.* 69:3897-3899.

GANGULY, A. & D.J. PROCKOP. 1990. Detection of single-base mutations by reaction of DNA heteroduplexes with a water-soluble carbodiimide followed by primer extension: application to products from the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18:3933-3939.

GARDINER, E.M. & P. TATTERSALL. 1988. Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J. Virol.* 62:1713-1722.

GIBELLINI, D., M. ZERBINI, M. MUSIANI, S. VENTUROLI, G. GENTILOMI & M. LA PLACA. 1993. Microplate capture hybridization of amplified parvovirus B19 DNA fragment labelled with digoxigenin. *Mol. Cell. Probes* 7:453-458.

GILLILAND, G., S. PERRIN, K. BLANCHARD & H.F. BUNN. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2725-2729.

GIRARD, M. & L. HIRT. 1989. *Virologie moléculaire*. Doin (éds.), Paris.

GOGOS, J.A., M. KARAYIORGOU, H. ABURATANI & F.C. KAFATOS. 1990. Detection of single base mismatches of thymine and cytosine residues by potassium permanganate and hydroxylamine in the presence of tetrakylammonium salts. *Nucleic Acids Res.* 18:6807-6814.

GOODMAN, M.F. 1995. DNA polymerase fidelity: misinsertions and mismatched extensions; dans *PCR Strategies*: M.A. Innis, D.H. Gelfand & J.J. Sninsky (éds). Academic Press, San Diego, CA. Pages 17-31.

GOSWAMI, B.B., W.H. KOCH & T.A. CEBULA. 1994. Competitor template RNA for detection and quantitation of hepatitis A virus by PCR. *BioTechniques* 16:114-121.

GU, M.L., F.X. CHEN & S.L. RHODE. 1992. Parvovirus H-1 P38 promoter requires the trans-activation region (tar), and SP1 site, and TATA box for full activity. *Virology* 187:10-17.

GU, Z., S. PLAZA, M. PERROS, C. CZIEPLUCH, J. ROMMELAERE & J.J. CORNELIS. 1995. NF-Y controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interaction with an unusual binding site. *J. Virol.* 69:239-246.

GUESDON, J.-L. 1992. Immunoenzymatic techniques applied to the specific detection of nucleic acids. A review. *J. Immunol. Methods* 150:33-49.

HARDING, M.J. & T.W. MOLITOR. 1992. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication. *Arch. Virol.* 123:323-333.

HARJU, L., P. JÄNNE, A. KALLIO, M.-L. LAUKKANEN, I. LAUTENSCHLAGER, S. MATTINEN, A. RANKI, V.R.X. SOARES, H. SÖDERLUND & A.-C. SYVÄNEN. 1990. Affinity-based collection of amplified viral DNA: application to the detection of human immunodeficiency virus type 1, human cytomegalovirus and human papillomavirus type 16. *Mol. Cell. Probes* 4:223-235.

HARLOW, E. & D. LANE. 1988. *Antibodies - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.

HAYWARD-LESTER, A., P.J. OEFNER & P.A. DORIS. 1996. Rapid quantification of gene expression by competitive RT-PCR and Ion-Pair Reversed-Phase HPLC. *BioTechniques* 20:250-257.

HÉBERT, B., J. BERGERON, E.F. POTWOROWSKI & P. TIJSSEN. 1993. Increased PCR sensitivity by using paraffin wax as a reaction mix overlay. *Mol. Cell. Probes* 7:249-252.

HIRT, B. 1967. Selective extraction of polyoma virus DNA from infected cell cultures. *J. Mol. Biol.* 36:365-369.

HUANG, M.M., N. ARNHEIM & M.F. GOODMAN. 1992. Extensions of base mispairs by *Taq* DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Res.* 20:4567-4573.

HUGHES, T. 1990. False positive results with PCR to detect leukaemia-specific transcript. *Lancet* II:1037-1038.

ICTV. 1991. Fifth Report: Classification and Nomenclature of Viruses. R.I.B. Francki, C.M. Fauquet, D.L. Knudson, F. Brown (éds.). Springer-Verlag Wien, New York. *Arch. Virol. Supp* 2.

ICTV. 1995. Sixth Report: Virus Taxonomy. F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, M.D. Summers (éds.). Springer-Verlag Wien, New York. *Arch. Virol. Supp* 10.

IIZUKA, M., S. MASHIYAMA, M. OSHIMURA, T. SEKIYA & K. HAYASHI. 1992. Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. *Genomics* 12:139.

ILAND, H.J. & A.V. TODD. 1992. Estimation of the proportions of mutant and normal N-ras alleles by allele specific restriction analysis. *Nucleic Acids Res.* 20:620.

INNIS, M.A. & D.H. GELFAND. 1990. Optimization of PCRs; dans PCR Protocols: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (éds). Academic Press, San Diego, CA. Pages 3-12.

JALAVA, T., P. LEHTOVAARA, A. KALLIO, M. RANKI & H. SÖDERLUND. 1993. Quantification of hepatitis B virus DNA by competitive amplification and hybridization on microplates. *BioTechniques* 15:134-139.

JEFFREYS, A.J., V. WILSON, R. NEUMANN & J. KEYTE. 1988. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res.* 16:10,953-10,971.

JENKINS, C.E. 1992. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine parvovirus in fetal tissues. *J. Virol. Meth* 39:179-184.

KALIN, I., S. SHEPHARD & U. CANCRIAN. 1992. Evaluation of the ligase chain reaction (LCR) for the detection of point mutations. *Mut. Res.* 283:119-123.

KELLER, G.H., D.-P. HUANG & M.M. MANAK. 1989. A sensitive nonisotopic hybridization assay for HIV-1 DNA. *Anal. Biochem.* 177:27-32.

KELLER, G.H., D.-P. HUANG, J.W.K. SHI & M.M. MANAK. 1990. Detection of hepatitis β virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *J. Clin. Microb.* 28:1411-1416.

- KELLOG, D.E., J.J. SNINSKY & S. KWOK. 1990. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 189:202-208.
- KILHAM, L. 1961. Mongolism associated with rat virus (RV) infection in hamster. *Virology* 13:141-143.
- KILHAM, L. & G. MARGOLIS. 1975. Problems of human concern arising from animal models of intrauterine and neonatal infections due to viruses: a review. I. Introduction and virologic studies. *Prog. Med. Virol.* 20:113-143.
- KRADY, J.K. & D.C. WARD. 1995. Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol. Cell. Biol.* 15:524-533.
- KRESSE, J.I., W.D. TAYLOR, W.W. STEWART & K.A. EERNISSE. 1985. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Vet. Microbiol.* 10:525-531.
- KURTZMAN, G., N. FRICKHOFEN, J. KIMBALL, D.W. JENKINS, A.W. NIENHUIS & N.S. YOUNG. 1989. Pure red-cells aplasia of 10 years duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N. Engl. J. Med.* 321:519-523.
- KWOK, S. 1990. Procedures to minimize PCR-product carry-over; dans *PCR Protocols*: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (éds). Academic Press, San Diego, CA. Pages 142-145.
- KWOK, S. & R. HIGUCHI. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-238.
- KWOK, S., D.E. KELLOGG, N. MCKINNEY, D. SPASIC, L. GODA, C. LEVENSON & J.J. SNINSKY. 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 18:999-1005.
- LAGER, K.M., W.L. MENGELING & W. LIU. 1992. Comparison of the virulence of two isolates of porcine parvovirus in 72-day-old porcine fetuses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:245-248.
- LANDERGREN, U., R. KAISER, J. SANDERS & L. HOOD. 1988. A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241:1077-1080.

- LANDGRAF, A., B. RECKMANN & A. PINGOUD. 1991a. Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Anal. Biochem.* 193:231-235.
- LANDGRAF, A., B. RECKMANN & A. PINGOUD. 1991b. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal. Biochem.* 198:86-91.
- LEHTOVAARA, P., M. UUSI-OUKARI, P. BUCHERT, M. LAAKSONEN, M. BENGSTSTRÖM & M. RANKI. 1993. Quantitative PCR for hepatitis B virus with colorimetric detection. *PCR Meth. Appl.* 3:169-175.
- LENGHAUS, C., A.J. FORMAN & C.J. HALE. 1978. Experimental infection of 35, 50 and 60 day old fetuses with porcine parvovirus. *Aust. Vet. J.* 54:418-422.
- LI, X. & S.L. RHODE. 1991. Nonstructural protein NS-2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cell *in vivo* and *in vitro*. *Virology* 184:117-130.
- LINSER, P., H. BRUNING & R.W. ARMENTROUT. 1977. Specific binding site for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J. Virol.* 24:211-221.
- LIU, Q., C.B. YONG & C.R. ASTELL. 1994. *In vitro* resolution of the dimer bridge of the minute virus of mice (MVM) genome supports the modified rolling hairpin model for MVM replication. *Virology* 201:251-262.
- LONGO, M. & J.L. HARTLEY. 1990. Storage of dilute solutions of DNA. *Focus* 12:116-117.
- LONGO, M.C., M.S. BERNINGER & J.L. HARTLEY. 1990. Use of Uracil DNA Glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125-128.
- LUNDERBERG, J., J. WAHLBERG & M. UHLEN. 1991. Rapid colorimetric quantification of PCR-amplified DNA. *BioTechniques* 10:68-75.
- MAHBUBANI, M.H. & A.K. BEJ. 1994. Applications of polymerase chain reaction methodology in clinical diagnostics; dans *PCR Technology - Current Innovations*: H.G. Griffin & A.M. Griffin (éds). CRC Press, Boca Raton, FA. Pages 307-326.
- MARCH, J.B. 1990. The effect of freezing on DNA in solution. *Focus* 12:113-114.

MARGOLIS G. & L. KILHAM. 1975. Problems of human concern arising from animal models of intrauterine and neonatal infections due to viruses: a review. II. Pathologic studies. *Prog. Med. Virol.* 20:144-179.

MARTINEZ, C., K. DALSGAARD, J.A. LOPEZ DE TURISO, E. CORTES, C. VELA & J.I. CASAL. 1992. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine* 10:684-690.

McMASTER, G.K., P. BEARD, H.D. ENGERS & B. HIRT. 1981. Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to minute virus of mice. *J. Virol.* 38:317-326.

MENDELMAN, L.V., J. PETRUSKA & M.F. GOODMAN. 1990. Base mispair extension kinetics: comparison of DNA polymerase α and reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* 265:2338-2346.

MENGELING, W.L. & R.C. CUTLIP. 1975. Pathogenesis of *in utero* infection: experimental infection of 5-week old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* 36:1173-1177.

MENGELING, W.L. & R.C. CUTLIP. 1976. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* 37:1393-1400.

MENGELING, W.L., Z. PEJSAK & P.A. PAUL. 1984. Biological assay of attenuated strain NADL-2 and virulent strain NADL-8 of porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* 45:2403-2407.

MENZO, S., P. BAGNARELLI, M. GIACCA, A. MANZIN, P.E. VERALDO & M. CLEMENTI. 1992. Absolute quantitation of viremia in human immunodeficiency virus infection by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:1752-1757.

MOLITOR, T.W., H.S. JOO & M.S. COLLETT. 1984. Porcine parvovirus DNA: characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates. *Virology* 137:241-254.

MOLITOR, T.W. & H.S. JOO. 1990. Clinical and pathological features of porcine-parvovirus-related disease and its diagnosis; dans *Handbook of Parvoviruses*, vol II: P. Tijssen (éd.). CRC Press, Boca Raton, FLA. Pages 135-150.

- MOLITOR, T.W., K. ORAVEERAKUL, Q.Q. ZHANG, C.S. CHOI & L.R. LUDEMANN. 1991. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *J. Virol. Meth.* 32:201-212.
- MORRISSEY, D.V. & M.L. COLLINS. 1989. Nucleic acid hybridization assays employing dA-tailed capture probes. Single capture methods. *Mol. Cell. probes* 3:189-207.
- MULLIS, K.B. 1991. The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodesoxyribonucleotide fusion. *PCR Meth. Appl.* 1:1-4.
- MURPHY, L.D., C.E. HERZOG, J.B. RUDICK, A.T. FOJO & S.E. BATES. 1990. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry* 29:10351-10356.
- MYERS, R.M., N. LUMELSKY, L. LERMAN & T. MANIATIS. 1985. Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature* 313:495-498.
- MYERSON, D. 1992. Avant-propos de PCR: Clinical Diagnostics and Research. A. Rolfs, I. Schuller, U. Finckh & I. Weber-Rolfs (éds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- NAEGER, L.K., J. CARTER & D.J. PINTEL. 1990. The small nonstructural protein (NS-2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner. *J. Virol.* 64:6166-6175.
- NAGAMINE, C.M., K. CHAN & Y.-F.C. LAU. 1989. A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am. J. Hum. Genet.* 45:337-339.
- NAGATA, Y., H. YOKOTA, O. KOSUDA, K. YOKOO, K. TAKEMURA & T. KILUCHI. 1985. Quantification of picogram levels of specific DNA immobilized in microtiter wells. *FEBS Letters* 183:379-382.
- NEUBAUER, A., B. NEUBAUER & E. LIU. 1990. Polymerase chain reaction based assay to detect allelic loss in human DNA: loss of β -interferon gene in chronic myelogenous leukemia. *Nucleic Acids Res.* 18:993-998.
- NEWTON, C.R., A. GRAHAM, L.E. HEPINSTALL, S.J. POWELL, C. SUMMERS, N. KALSHEKER, J.C. SMITH & A.F. MARKAM. 1989. Analysis of any mutation in DNA: the amplification refractory mutation system. *Nucleic Acids Res.* 17:2503-2516.

NIKIFOROV, T.T. & Y.-H. ROGERS. 1995. The use of 96-well polystyrene plates for DNA hybridization-based assays: an evaluation of different approaches to oligonucleotide immobilization. *Anal. Biochem.* 227:201-209.

NOONAN, K.E., C. BECK, T.A. HOLZMAYER, J.E. CHIN, J.S. WUNDER, I.L. ANDRULIS, A.F. GAZDAR, C.L. WILLMAN, B. GRIFFITH, D.D. VON HOFF & I.B. RONINSON. 1990. Quantitative analysis of *MDR1* (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7160-7164.

NOORDHOEK, G.T., A.H.J. KOLK, G. BJUNE, D. CATTY, J.W. DALE, P.E.M. FINE, P. GODFREY-FAUSSETT, S.-N. CHO, T. SHINNICK, S.B. SVENSON, S. WILSON & J.D.A. VAN EMBDEN. 1994. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J. Clin. Microb.* 32:277-284.

NÜESCH, J.P.F., S.F. COTMORE & P. TATTERSALL. 1995. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* 209:122-135.

OKAYAMA, H., D.T. CURIEL, M.L. BRANTLY, M.D. HOLMES & R.G. CRYSTAL. 1989. Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. *J. Lab. Clin. Med.* 114:105-113.

ORAVEERAKUL, K., C.S. CHANG & T.W. MOLITOR. 1992. Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J. Virol.* 66:715-722.

ORAVEERAKUL, K., C.S. CHOI & T.W. MOLITOR. 1993. Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine. *Arch. Virol.* 130:377-389.

ORITA, M., Y. SUZUKI, T. SEKIYA & K. HAYASHI. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879.

OSER, A. & G. VALET. 1988. Improved detection by time-resolved fluorometry of specific DNA immobilized in microtiter wells with europium/metal-chelator labelled DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 16:8178.

OU, C.-Y., S.H. McDONOUGH, D. CABANAS, T.B. RYDER, M. HARPER, J. MOORE & G. SCHOCHETMAN. 1990. Rapid and quantitative detection of enzymatically amplified HIV-1 DNA using chemiluminescent oligonucleotide probes. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 6:1323-1329.

PANG, S., Y. KOYANAGI, S. MILES, C. WILEY, H.V. VINTERS & I.S.Y. CHEN. 1990. High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature* 343:85-89.

PANNETIER, C., S. DELASSUS, S. DARCHE, C. SAUCIER & P. KOURILSKY. 1993. Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.* 21:577-583.

PARRISH, C.R., C.F. AQUADRO & L.E. CARMICHAEL. 1988. Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses. *Virology* 166:293-307.

PARRISH, C.R. 1991. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* 183:195-205.

PARRISH C.R. 1995. Molecular epidemiology of parvoviruses. *Seminar Virol.* 6:415-418.

PATTISON, J.R. 1990. Parvoviruses: medical and biological aspects; dans *Virology*, 2nd edn: B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.* (éds.). Raven Press, New York. Pages 1765-1782.

PAUL, P.S. & W.L. MENGELING. 1980. Evaluation of a modified-live virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive disease in swine. *Am. J. Vet. Res.* 41:2007-2011.

PAUL, P.S. & W.L. MENGELING. 1984. Oronasal and intramuscular vaccination of swine with a modified-live porcine parvovirus vaccine: multiplication and transmission of vaccine virus. *Am. J. Vet. Res.* 45:2481-2485.

PAYMENT, P. & M. TRUDEL. 1989. *Manuel de techniques virologiques*. Presses de l'Université du Québec, Québec.

PETTY, E.M., E. GOLD & A.E. BALE. 1992. DNA diagnosis with mutation-specific artificial methylation sites: application to rapid screening of Δ F508. *Clin. Chem.* 38:2422-2425.

PCR: Clinical Diagnostics and Research. 1992. A. Rolfs, I. Schuller, U. Finckh & I. Weber-Rolfs (éds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

PIATAK, M., JR KA-CHEUNG LUK, B. WILLIAMS & J.D. LIFSON. 1993. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *BioTechniques* 14:70-81.

PO, T., G. STEGER, V. ROSENBAUM, J. KAPER & D. RIESNER. 1987. Double-stranded cucumovirus associated RNA 5: experimental analysis of necrogenic and non-necrogenic variants by temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids* 15:5069-5083.

POLSKY-CYNKIN, R., G.H. PARSONS, L. ALLERDT, G. LANDES, G. DAVIES & A. RASHTCHIAN. 1985. Use of DNA immobilized on plastic agarose supports to detect DNA by sandwich hybridization. *Clin. Chem.* 31:1438-1443.

PORCHER, C., M-C. MALINGE, C. PICAT & B. GRANDCHAMP. 1992. A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. *BioTechniques* 13:106-113.

PORTER, D.D. & H.J. CHO. 1980. Aleutian disease of minks: a model for persistent infection. *Compr. Virol.* 16:233-256.

RAEYMAEKERS, L. 1993. Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Anal. Biochem.* 214:582-585.

RANZ, A.I., J.J. MANCLUS, E. DIAZ-AROCA & J.I. CASAL. 1989. Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. *J. Gen. Virol.* 70:2541-2553.

RAPPOLEE, D.A., A. WANG, D. MARK & Z. WERB. 1989. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. *J. Cell. Biochem.* 39:1-11.

RASMUSSEN, S.E. 1990. Covalent immobilization of biomolecules onto polystyrene microwells for use in biospecific assays. *Ann. Biol. Clin.* 48:647-650.

RASMUSSEN, S.R., M.R. LARSEN & S.E. RASMUSSEN. 1991. Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end. *Anal. Biochem.* 198:138-142.

RAWADI, G. & O. DUSSURGET. 1995. Advances in PCR-based detection of mycoplasmas contaminating cell cultures. *PCR Meth. Appl.* 4:199-208.

REISCHL, U. & B. KOCHANOWSKI. 1995. Quantitative PCR: a survey of the present technology. *Mol. Biotechnology* 3:55-71.

RHODE, S.L., III. 1973. Replication process of the parvovirus H-1. I. Kinetics in parasynchronous cell system. *J. Virol.* 11:856-861.

RHODE, S.L., III & P.R. PARADISO. 1983. Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J. Virol.* 45:173-184.

RIDPATH, J.F. & W.L. MENGELING. 1988. Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res.* 10:17-28.

ROMMENS, J., B.-T. KEREM, W. GREER, P. CHANG, L.-C. TSUI & P. RAY. 1990. Rapid nonradioactive detection of the major cystic fibrosis mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 46:395-396.

ROSSMANN, M.G. & J.E. JOHNSON. 1989. Icosahedral RNA virus structure. *Ann. Rev. Biochem.* 58:533-573.

RUNNING, J.A. & M.S. URDEA. 1990. A procedure for productive coupling of synthetic oligonucleotides to polystyrene microtiter wells for hybridization capture. *Biotechniques* 8:276-277.

SACHS, A.B. 1993. Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74:413-421.

SAIKI, R.S., S. SCHARF, F. FALOONA, K.B. MULLIS, G.T. HORN, H.A. ERLICH & N. ARNHEIM. 1985. Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.

SAIKI, R.S., D.H. GELFAND, F. STOFFEL, S.J. SCHARE, R. HIGUGHI, G.T. HORN, K.B. MULLIS & H.A. ERLICH. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

SAKURAI, M., T. NISHIMORO, C. USHIMI & H. NAKAJIMA. 1989. Nucleotide sequence of capsid gene of porcine parvovirus. *Virus Res.* 13:79-86.

SALVINO, R., M. SKIADOPOULOS, E.A. FAUST, P. TAM, R.O. SHADE & C.R. ASTELL. 1991. Two spatially distinct genetic elements constitute a bipartite DNA replication origin in the minute virus of mice genome. *J. Virol.* 65:1352-1363.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning - A Laboratory Manual*, 2nd edn., Vol. I, II et III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.

- SANGER, F., S. NICKLEN & A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- SARDELLI, A.D. 1991. GeneAmp PCR carry-over prevention kit (Perkin-Elmer Cetus). *Amplifications* 6:12-13.
- SARKAR, G. & S. SOMMER. 1990. Shedding light on PCR contamination. *Nature* 343:27.
- SARKAR, G. & M.E. BOLANDER. 1994. The "Looped Oligo" method for generating reference molecules for quantitative PCR. *BioTechniques* 17:864-866.
- SCHNITTMAN, S.M., M.C. PSALLIDOPOULOS, H.C. LANE, L. THOMPSON, M. BASELER, F. MASSARI, C.H. FOX, N.P. SALZMAN & A.S. FAUCI. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* 245:305-308.
- SEIBEL, P., O. MELL, A. HANNEMANN, J. MÜLLER-HÖCKER & B. KADENBACH. 1991. A method for quantitative analysis of deleted mitochondrial DNA by PCR in small tissue samples. *Methods Mol. Cell. Biol.* 2:147-153.
- SHADE, R.O., M.C. BLUNDELL, S.F. COTMORE, P. TATTERSALL & C.R. ASTELL. 1986. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J. Virol.* 58:921-936.
- SIEBERT, P.D. & W. LARRICK. 1993. PCR Mimics: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *BioTechniques* 14:244-249.
- SIEGL G. & M. GAUTSHI. 1973. The multiplication of parvovirus LuIII in synchronized culture system. I. Optimum conditions for virus replication. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 40:105-118.
- SIEGL, G. 1984a. Biology of pathogenicity of autonomous parvoviruses; dans *The Parvoviruses*: K.I. Berns (éd.). Plenum, New York. Pages 297-362.
- SIEGL, G. 1984b. Canine parvovirus: origin and significance of a "new" pathogen; dans *The Parvoviruses*: K.I. Berns (éd.). Plenum, New York. Pages 363-388.
- SIEGL G., R.C. BATES, K.I. BERNS, B.J. CARTER, D.C. KELLY, E. KURSTAK & P. TATTERSALL. 1985. Characteristic and taxonomy of parvoviridae. *Intervirology* 23:61-73.

SIMMONDS, P., P. BALFE, J.F. PEUTHERER, C.A. LUDLAM, J.O. BISHOP & A.J. LEIGH BROWN. 1990. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers. *J. Virol.* 64:864-872.

SINGER-SAM, J., M.O. ROBINSON, A.R. BELLVE, M.I. SIMON & A.D. RIGGS. 1990. Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and *Zfy* gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* 18:1255-1259.

SINGER-SAM, J., J.M. LEBON, A. DAI & A.D. RIGGS. 1992. A sensitive, quantitative assay for measurement of allele-specific transcripts differing by a single nucleotide. *PCR Methods Applic.* 1:160-163.

SOMMER, S.S., J. CASSADY, J. SOBELL & C. BOTTEMA. 1989. A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria. *Mayo Clin. Proc.* 64:1361-1372.

SORRENTINO, R., C. IANNICOLA, S. COSTANZI, A. CHERSI & R. TOSI. 1991. Detection of complex alleles by direct analysis of DNA heteroduplexes. *Immunogenetics* 33:118-123.

STEVENSON, B., A.A. DISPIRITO & T.M. SCHMIDT. 1994. Reduction of enzyme adsorption to polypropylene surfaces in the presence of a nonionic detergent. *BioTechniques* 17:1048-1050.

SYKES, P.J., S.H. NEOH, M.J. BRISCO, E. HUGHES, J. CONDON & A.A. MORLEY. 1992. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques* 13:444-449.

SYVÄNEN, A.-C., M. LAAKSONEN & H. SÖDERLUND. 1986. Fast quantification of nucleic acid hybrids by affinity-based hybrid collection. *Nucleic Acids Res.* 14:5037-5048.

SYVÄNEN, A.-C., M. BENGTSTROM, J. TENHUNEN & H. SÖDERLUND. 1988. Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection. *Nucleic Acids Res.* 16:11327-11338.

TATTERSALL, P. 1972. Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J. Virol.* 10:586-590.

TATTERSALL, P. & D.C. WARD. 1976. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature (London)* 263:106-109.

- TATTERSALL, P., A.J. SHATKIN & D.C. WARD. 1977. Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *J. Virol. Biol.* 111:375-394.
- TELENTI, A., P. IMBODEN & D. GERMANN. 1992. Competitive polymerase chain reaction using an internal standard: application to the quantitation of viral DNA. *J. Virol. Meth.* 39:259-268.
- TENNANT, R.W., K.R. LAYMAN & R.E. HAND. 1969. Effect of cell physiological state on infection by rat virus. *J. Virol.* 4:872-879.
- THAM, T.N. & J.-L. GUESDON. 1992. Detection of point mutation in *bla T* genes of *Enterobacteriaceae* by biotinylated oligonucleotide probes using microwell hybridization and enzymofluorometric method. *Mol. Cell. Probes* 6:79-85.
- TIJSSEN, P. 1993. Hybridization with Nucleic Acid Probes, Vol. I et II (Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, vol. 24). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- TIJSSEN, P. & J. BERGERON. 1994. Parvoviruses: rodents, pigs, cattle and geese; dans *Encyclopedia of Virology*: R.G. Webster & A. Granoff (éds.). Academic Press, San Diego, CA. Pages 1067-1075.
- TIJSSEN, P., J. BERGERON, R. DUBUC & B. HÉBERT. 1995. Minor genomic changes among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties. *Seminars Virol.* 6:319-328.
- TIJSSEN P. & M. BERGOIN. 1995. Densonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Seminars Virol.* 6:347-355.
- TOOLAN, H.W. 1960. Experimental production of mongoloid hamster. *Science* 131:1446-1448.
- TRESNAN, D.B., L. SOUTHARD, W. WEICHERT, J.Y. SGRO & C.R. PARRISH. 1995. Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine parvovirus capsid. *Virol.* 211:123-132.
- TRUYEN, U. & C.R. PARRISH. 1992. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 66:5399-5408.

TRUYEN, U. & C.R. PARRISH. 1995. The evolution and control of parvovirus host ranges. *Seminars Virol.* 6:311-317.

TSAO, J., M.S. CHAPMAN, M. AGBANDJE, W. KELLER, K. SMITH, H. WU, M. LUO, T.J. SMITH, M.G. ROSSMANN, R.W. COMPANS & C.R. PARRISH. 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251:1456-1464.

VANDEN HEUVAL, J., F. TYSON & D. BELL. 1993. Construction of recombinant RNA templates for use as internal standards in quantitative RT-PCR. *BioTechniques* 14:395-398.

VANDENVELDE, C., M. VERSTRAETE & D. VAN BEERS. 1990. Fast Multiplex polymerase chain reaction on boiled clinical samples for rapid viral diagnosis. *J. Virol. Meth.* 30:215-228.

VASUDEVACHARYA, J., S. BASAK, R.V. SRINIVAS & R.W. COMPANS. 1990. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of porcine parvovirus, strain NADL-2. *Virology* 178:611-616.

VASUDEVACHARYA, J. & R.W. COMPANS. 1992. The NS and capsid genes determine the host range of porcine parvovirus. *Virology* 184:515-524.

WALLACE, R.B., M. JOHNSON, T. HIROSE, T. MIYAKE, E. KAWASHIMA & K. ITAKURA. 1981. The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β -globin DNA. *Nucleic Acids Res.* 9:879-894.

WAN, C-Y. & T.A. WILKINS. 1993. Spermidine facilitates PCR amplification of target DNA. *PCR Meth. Appl.* 3:208-210.

WANG, A.M., M.V. DOYLE & D.F. MARK. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9717-9721.

WARD, D.C. & P. TATTERSALL. 1982. Minute virus of mice; dans *The Mouse in Biochemical Research*, vol II: H.L. Foster, J.D. Small & J.G. Fox (éds.). Academic Press, New York. Pages 313-332.

WETMUR, J.G. & J.J. SNINSKY. 1995. Nucleic acid hybridization and unconventional bases; dans *PCR Strategies*: M.A. Innis, D.H. Gelfand & J.J. Sninsky (éds.). Academic Press, San Diego, CA. Pages 69-83.

WIESNER, R.J. 1992. Direct quantification of picomolar concentrations of mRNAs by mathematical analysis of a reverse transcription/exponential polymerase chain reaction assay. *Nucleic Acids Res.* 20:5863-5864.

WRIGHT, P.P. & D. WYNFORD-THOMAS. 1990. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J. Pathol.* 162:99-117.

WU, D.Y., L. UGOZZOLI, B.K. PAL & B. WALLACE. 1989. Allele-specific enzymatic amplification of β -globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2757-2760.

WU, H. & M.G. ROSSMANN. 1993. The canine parvovirus empty capsid structure. *J. Mol. Biol.* 233:231-244.

YAP, E.P.H., Y.M.O. LO, K.A. FLEMMING & J.O'D. MCGEE. 1994. False-positives and contamination in PCR; dans *PCR Technology - Current Innovations*: H.G. Griffin & A.M. Griffin (éds). CRC Press, Boca Raton, FA. Pages 249-258.

YASUHARA, H., O. MATSUI, T. HIRAHARA, T. OHGITANI, M. TANAKA, K. KODAMA, M. NAKAI & N. SASAKI. 1989. Characterization of a parvovirus isolated from the diarrheic feces of a pig. *Jpn. J. Vet. Sci.* 51:337-344.

YASUHARA, H., O. MATSUI, T. HIRAHARA, A. IZUMIDA, K. KODAMA, M. NAKAI & Y. INABA. 1993. The characteristics of another small DNA virus isolated from a pig with diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.* 55:1057-1058.

YOSHINO, K., K. NISHIGAKI & Y. HUSIMI. 1991. Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. *Nucleic Acids Res.* 19:3153.